



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

**Vânia Patrícia da
Silva Ventura**

**Pesquisa do Cromossoma Y na Síndrome de
Turner**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

**Vânia Patrícia da
Silva Ventura**

**Pesquisa do Cromossoma Y na Síndrome de
Turner**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Fernandes do Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao meu marido e à minha família pelo
incansável apoio e carinho.

o júri

Presidente

Professora Doutora Helena Silva

professora auxiliar do departamento de biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Susana Fernandes

técnica superior principal do departamento de genética da FMUP

Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira

professora associada com agregação ao departamento de biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Carla Isabel Pinto Moura

professora auxiliar convidada da FMUP

agradecimentos

Antes de mais quero agradecer ao Professor Doutor Alberto Barros, Director do Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto por ter-me dado a oportunidade de realizar todo o trabalho prático neste serviço. Desta forma foi possível desenvolver mais um projecto motivador da minha carreira na área pela qual tentarei no futuro ser ainda melhor.

Gostaria de deixar um agradecimento muito especial à Doutora Susana Fernandes pelo apoio, dedicação, prontidão, profissionalismo e principalmente pelo carinho, ajuda e paciência demonstrada desde o primeiro dia. Todos os momentos passados juntas e todos os ensinamentos serão para sempre guardados. Muito obrigada por tudo.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, co-orientadora da tese, e à Professora Doutora Sofia Dória do Serviço de Genética, quero agradecer toda a ajuda e disponibilidade que demonstraram durante o decorrer deste trabalho.

Agradeço ainda à Professora Doutora Filipa Carvalho a ajuda, o carinho e a disponibilidade que demonstrou sempre que precisei.

Quero deixar um agradecimento muito especial à Dra. Carolina, pela amizade, dedicação, carinho, companheirismo e ajuda que demonstrou sempre, ao longo de todo o trabalho.

Às Mestres Berta e Ana Paula e à Dra. Graça pela paciência que tiveram em ajudar-me em todas as dúvidas que foram surgindo no decorrer do trabalho. Muito obrigada pelo carinho.

Não posso deixar de agradecer aos restantes colaboradores do Serviço de Genética pela boa disposição e carinho que sempre demonstraram.

Por fim, e como os primeiros são sempre os últimos, não poderia deixar de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida... os meus pais. Obrigada por me terem dado a vossa mão nos momentos que mais precisei, pela motivação que sempre demonstraram e pelos valores que sempre me inculiram. Obrigada pelo vosso amor, carinho e ajuda.

Ao Rui pelo seu carinho, amor, compreensão e empenho demonstrado em ajudar-me sempre...na concretização de mais uma etapa da minha vida.

Obrigada a todos.

palavras-chave

Síndrome de Turner; 45,X; gonadoblastoma; sequências do cromossoma Y; PCR.

resumo

A Síndrome de Turner é uma cromossomopatia que consiste na presença de um único cromossoma X normal na mulher. A incidência desta patologia é de aproximadamente 1 em cada 2500 nados vivos femininos. Para além da monossomia do cromossoma X, podem co-existir outras linhas celulares com dois ou mais cromossomas X, cromossomas com anomalias estruturais e ainda a presença do cromossoma Y, completo ou parte dele. A presença deste cromossoma nas pacientes com Síndrome de Turner representa um risco aumentado (15-30%) de desenvolvimento de gonadoblastoma.

No presente trabalho propõe-se determinar a presença de genes mapeados no cromossoma Y (*SRY*, *TSPY*, *DDX3Y* e *HSFY*) em indivíduos com Síndrome de Turner e avaliar a importância de um teste molecular para a detecção de sequências do cromossoma Y, que escapam à detecção por técnicas de citogenética convencional. Detectou-se, usando a técnica de PCR, uma frequência de 4,08% de amostras com material do cromossoma Y presente em linhas celulares minoritárias. Pode pois concluir-se que este tipo de análise constitui um método complementar de diagnóstico contribuindo assim para um diagnóstico mais preciso.

keywords

Turner syndrome; 45,X; gonadoblastoma; Y chromosome sequences; PCR

abstract

Turner syndrome is a chromosomal disorder characterized by the presence of a single normal X chromosome in women. The incidence of this disease is approximately 1 in 2500 live female births.

Additionally the X chromosome monosomy, other cell lines could co-exist, containing two or more X chromosomes, chromosomes with structural abnormalities and even cell lines containing the Y chromosome, or part of it. The presence of this chromosome in patients with Turner syndrome represents an increased risk (15-30%) of developing gonadoblastoma.

The aim of the present study is to determine the presence of genes mapped on Y chromosome, namely *SRY*, *TSPY*, *DDX3Y* and *HSFY*, in Turner syndrome patients and evaluate the importance of a molecular test for detection of Y chromosome sequences, which escape to detection by conventional cytogenetic techniques.

A frequency of 4.08% of samples with Y chromosome material present in minority cell lines was detected using the PCR technique. It can be assumed that this type of analysis is a complementary diagnostic method thus contributing to a more accurate clinical diagnosis.

ÍNDICE

1. Síndrome de Turner.....	1
1.1 Perspectiva histórica e incidência.....	1
1.2 Características clínicas da Síndrome de Turner	2
1.2.1 Fertilidade nas pacientes com Síndrome de Turner	6
1.2.2 Desenvolvimento psicomotor e comportamental.....	8
1.3 Perfil citogenético da Síndrome de Turner	8
1.4 Diagnóstico na Síndrome de Turner	10
1.4.1 Diagnóstico Pré-Natal	10
1.4.2 Diagnóstico Pós-Natal	11
1.5 O cromossoma Y na Síndrome de Turner.....	12
1.6 Gonadoblastoma	14
1.7 Sequências do cromossoma Y no gonadoblastoma.....	15
1.8 Métodos de análise alternativos.....	18
1.8.1 FISH - <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>	18
1.8.2 PCR - <i>Polymerase Chain Reaction</i>	20
1.8.3 Electroforese capilar.....	23
2. Objectivos	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1 Amostra.....	25
3.2 Análise citogenética.....	25
3.2.1 Sangue periférico - cultura e preparação de lâminas – procedimento.....	25

3.2.2	Produtos de abortamento – cultura de fibroblastos e preparação de lâminas – procedimento.....	27
3.2.3	Líquido amniótico – cultura de fibroblastos e preparação de lâminas – procedimento.....	28
3.3	Análise Molecular.....	30
3.3.1	Extracção de DNA	30
3.3.2	PCR – Caracterização molecular das sequências do cromossoma Y.....	32
4.	Resultados.....	35
4.1	Integridade do DNA.....	37
4.2	Pesquisa das sequências do cromossoma Y	38
5.	Discussão e Conclusão	42
6.	Perspectivas futuras.....	47
7.	Bibliografia	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cariótipo da Síndrome de Turner (45,X).	2
Figura 2: Localização citogenética do gene <i>SHOX</i> (<i>short stature homeobox gene</i>)	3
Figura 3: Manifestações clínicas na Síndrome de Turner	3
Figura 4: Manifestações clínicas mais frequentes da Síndrome de Turner em recém-nascidos	5
Figura 5: Mecanismo da produção da aneuploidia.	9
Figura 6: Esquematização dos diferentes tipos de mosaico	9
Figura 7: Feto com 11 semanas onde é visível uma acumulação de líquido na região da nuca.	11
Figura 8: Estrutura do cromossoma Y	12
Figura 9: Esquema do cromossoma X e Y com indicação das regiões pseudoautosómicas PAR1 e PAR2.	13
Figura 10: Representação esquemática do cromossoma Y com indicação da região GBY e das sub-divisões da região AZF associada a falhas na espermatogénese	15
Figura 11: Técnica de FISH	19
Figura 12: Elementos necessários para a realização de um PCR.	20
Figura 13: Esquematização das três etapas que constituem um ciclo da técnica de PCR.	21
Figura 14: Esquema do funcionamento do sistema QIAxcel.	23
Figura 15: Cariótipo – 45,X.	36
Figura 16: Cariótipo - 46,X,del(X)(q24).	36
Figura 17: Cariótipo - 46,X,inv dup del (X) (qter--->q24 :: p22.1 --->qter).	36
Figura 18: Electroforese capilar após PCR para o gene <i>AMXY</i>	38

Figura 19: Electroforese capilar após PCR para o gene <i>SRY</i>	39
Figura 20: Electroforese capilar após PCR Multiplex para o gene <i>TSPY</i>	40
Figura 21: Electroforese capilar após PCR para o gene <i>DDX3Y</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas da Síndrome de Turner ordenadas segundo a sua frequência	4
Tabela 2: Manifestações clínicas com maior frequência na Síndrome de Turner, segundo a idade do diagnóstico.....	5
Tabela 3: Diferentes cariótipos encontrados em pacientes com Síndrome de Turner....	10
Tabela 4: Mistura de reacção total para a reacção de PCR do gene <i>AMXY</i>	32
Tabela 5: Mistura de reacção para as reacções de PCR dos genes <i>SRY</i>	33
Tabela 6: Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas quatro reacções de PCR e respectivas temperaturas de <i>annealing</i>	33
Tabela 7: Mistura de reacção para as reacções de PCR do gene <i>DDX3Y</i>	34
Tabela 8: Mistura de reacção para as reacções de PCR dos genes <i>HSFY</i>	34
Tabela 9: Amostras de sangue periférico e respectivos cariótipos.	35
Tabela 10: Amostras de produtos de abortamento e respectivos cariótipos.	37
Tabela 11: Amostras de líquidos amnióticos e respectivos cariótipos.	37
Tabela 12: Resultados obtidos para o gene da <i>AMXY</i>	37
Tabela 13: Resultados obtidos para o gene <i>SRY</i>	38
Tabela 14: Resultados obtidos para o gene <i>TSPY</i>	39
Tabela 15: Resultados obtidos para o gene <i>DDX3Y</i>	40
Tabela 16: Resultados obtidos para o gene <i>HSFY</i>	40
Tabela 17: Resultados positivos nas diferentes amostras.	41

1. Síndrome de Turner

1.1 Perspectiva histórica e incidência

A Síndrome de Turner é uma cromossomopatia que consiste na presença de um único cromossoma X normal na mulher (Figura 1).

O primeiro investigador a descrever o que viria a ser denominado a Síndrome de Turner foi Giovanni Morgagni, um anatomista italiano que em 1768, com base na autópsia de uma mulher de baixa estatura, ausência de desenvolvimento mamário e de pêlos pubianos, malformações renais e disgenesia (qualquer anomalia do desenvolvimento) gonadal (Otero, 1995), classificando as anomalias encontradas num quadro clínico de Síndrome.

Em 1902, Otto Funke descreveu um caso de uma paciente de 15 anos e baixa estatura, com linfedema (edema dos vasos linfáticos) congénito, pescoço alado e disgenesia gonadal.

Em 1929, na Sociedade de Pediatria, Otto Ullrich relatou o caso de uma menina de oito anos que nascera com linfedema congénito e tinha pescoço alado, ptose palpebral (caimento excessivo da pálpebra superior, cobrindo anormalmente o olho), micrognatia (mandíbula inferior de tamanho pequeno), palato estreito, baixa estatura, implantação baixa da linha posterior do cabelo, mamilos invertidos e hipoplásicos. Ainda hoje este quadro clínico corresponde à descrição da disgenesia gonadal.

Em 1938, Henry Turner publicou um estudo sobre sete mulheres, com características de disgenesia gonadal semelhantes às narradas por Ullrich, incluindo anomalias dos cotovelos (*cubitus valgus*). Iniciou então o tratamento hormonal das pacientes, e a condição passou a ser conhecida como Síndrome de Ullrich-Turner, tendo sido o nome de Ullrich gradualmente abandonado na denominação da doença.

A primeira análise citogenética numa paciente com Síndrome de Turner só foi efectuada em Inglaterra, em 1959, por Ford e colaboradores (Ford *et al.*, 1959).

De uma forma geral, a Síndrome de Turner é caracterizada por baixa estatura, disgenesia gonadal e outras malformações congénitas, sendo a infertilidade a principal característica. É actualmente definida como uma Síndrome cromossómico, na qual apenas

um cromossoma X é funcional e o outro cromossoma sexual pode ter sido perdido ou ser anormal (Otero, 1995).

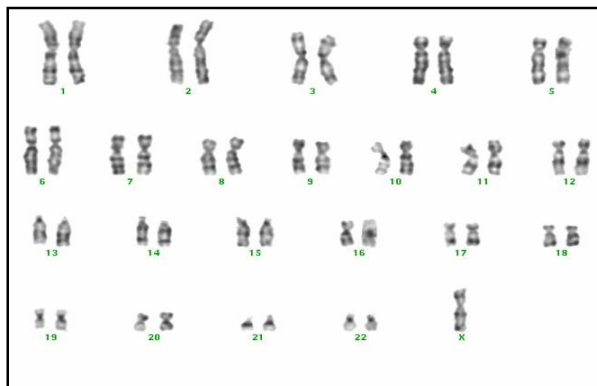


Figura 1: Cariótipo da Síndrome de Turner (45,X).

A incidência desta patologia é aproximadamente 1 em cada 2500 nados vivos femininos. No entanto, mais de 99% das concepções 45,X resultam em abortamento espontâneo, antes das 28 semanas de gestação (Wolff *et al.*, 2010).

A ausência de um dos cromossomas X (monossomia X) encontra-se com uma maior frequência nos abortamentos espontâneos do que em recém-nascidos. Este facto leva a pensar que as gestações que sobrevivem com um único cromossoma X serão efectivamente mosaicos, coexistindo com uma segunda linha celular, e que possuirão pelo menos uma parte de um segundo cromossoma X (Garagorri, 2004).

1.2 Características clínicas da Síndrome de Turner

A Síndrome de Turner apresenta características clínicas muito variáveis. Assim, as pacientes podem apresentar algumas manifestações muito frequentes tais como, a baixa estatura, que ocorre em 98% dos casos, pescoço alado e sintomas directamente relacionados com a disgenesia gonadal, nomeadamente a ausência de desenvolvimento pubertário, amenorreia primária e infertilidade (Scales *et al.*, 2010). Em 1997, foi isolado o gene *SHOX* (*short stature homeobox gene*) localizado em Xp22 e Yp11.3, na região pseudoautossómica dos cromossomas sexuais (Figura 2). Pensa-se que a haploinsuficiência deste gene seja responsável pela baixa estatura e pelas anomalias esqueléticas graves presentes nas pacientes com Síndrome de Turner.

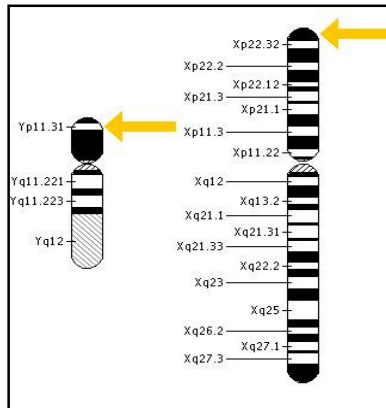


Figura 2: Localização citogenética do gene *SHOX* (*short stature homeobox gene* - adaptado de www.wix.com).

Há também manifestações clínicas mais graves como *pterygium colli* (pele redundante a sugerir “asas”, no ângulo do pescoço com os ombros), alargamento do diâmetro bi-acromial do tórax, implantação baixa do cabelo, rotação e dismorfias dos pavilhões auriculares de implantação baixa, *cubitus valgus* (antebraço mais inclinado para fora do que o braço), dificuldades visuais, cognitivas e motoras, e malformações renais e cardíacas (Figura 3). A hipertensão arterial está presente em 27% dos casos, havendo também maior incidência de tiroidite autoimune, diabetes *mellitus* na idade adulta, doença de Crohn e hemorragias gastrointestinais (Regateiro, 2003).

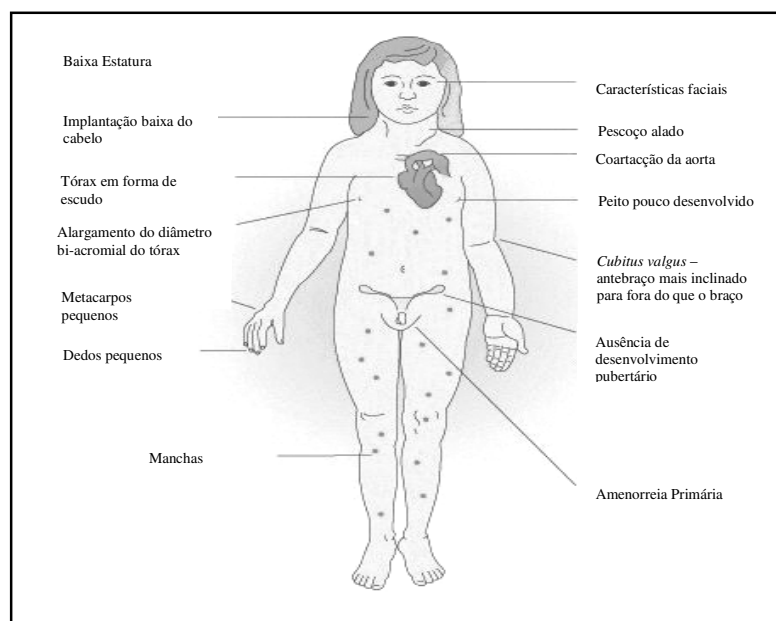


Figura 3: Manifestações clínicas na Síndrome de Turner (adaptado de <http://femalecare.net>).

Na Tabela 1, estão indicadas as manifestações clínicas da Síndrome de Turner, ordenadas segundo a sua frequência. Contudo, é importante referir que algumas delas dependem da anomalia citogenética de cada paciente, nomeadamente nos casos sem perda completa do cromossoma X ou nos mosaicos mais frequentes. Desta forma, o diagnóstico clínico precoce e a caracterização citogenética são importantes para aplicação/administração atempada do tratamento.

Tabela 1: Manifestações clínicas da Síndrome de Turner ordenadas segundo a sua frequência (adaptado de Garagorri *et al.*, 2004).

Características Clínicas	Incidência (%)
Baixa estatura	100
Infertilidade	> 99
Coeficiente SS/SI* anormal	97
Disgenesia gonadal	96
Características faciais	60
Cardiopatía congénita	55
<i>Cubitus valgus</i>	47
Implantação baixa do cabelo	42
Pescoço curto	40
Intolerância a carboidratos	40
Malformações renais	39
Palato estreito e alto	38
Metacarpos curtos	37
Joelho valgo ou varo (desvio da linha média do corpo)	35
Tireoidite de <i>Hashimoto</i>	34
Hipertensão arterial	27
Múltiplos nevos pigmentados	26
Pescoço alado (pregas cutâneas bilaterais)	25
Edemas no dorso das mãos e pés	22
Estrabismo	18
Escoliose	13
Displasia ungueal	13
Ptose palpebral	11
Hipotiroidismo	10
(*) SS/SI: Coeficiente segmento superior/segmento inferior	

Entre as ações terapêuticas inclui-se a administração de hormona de crescimento e a administração de ciclos de tratamentos com estrogêneos e progesterona, com início na puberdade, que permite o desenvolvimento normal de caracteres sexuais secundários. Contudo, deve ser realizado periodicamente um ecocardiograma, dado o risco de desenvolvimento de coartação da aorta (Scales *et al.*, 2010). Na Tabela 2, estão indicadas as manifestações clínicas mais frequentes na Síndrome de Turner, segundo a idade do diagnóstico.

Tabela 2: Manifestações clínicas mais frequentes na Síndrome de Turner, segundo a idade do diagnóstico (adaptado de Garagorri *et al.*, 2004).

Idade	Manifestações Clínicas
Recém-nascido	Edemas nos dorsos dos pés e das mãos (10-25%) Excesso de pele na nuca Pescoço alado
Lactante	Sopro cardíaco – Coartação da aorta
Infância	Baixa estatura
Adolescência	Ausência de desenvolvimento pubertário Puberdade pouco desenvolvida Escassos pêlos pubianos e axilares
Adolescência tardia	Amenorreia primária + Baixa estatura
Adulto	Infertilidade Ausência da menstruação Baixa estatura

Segundo a literatura, as mulheres com Síndrome de Turner têm um risco de morte 3 vezes superior ao da população em geral. No entanto, se incluirmos os casos de coartação da aorta ou outras cardiopatias, este risco pode aumentar cerca de 5 vezes mais. As principais causas de morte são as complicações derivadas das cardiopatias (Garagorri, 2004).



Figura 4: Manifestações clínicas mais frequentes da Síndrome de Turner em recém-nascidos:
A - excesso de pele na nuca; B e C - edema no dorso das mãos e pés (adaptado de Sybert *et al.*, 2004).

1.2.1 Fertilidade nas pacientes com Síndrome de Turner

Na maioria das pacientes com Síndrome de Turner ocorre falência ovárica antes ou durante a puberdade. Estas apresentam “vestígios gonadais” resultantes da atresia acelerada dos folículos ováricos e, como resultado, são inférteis. Para a grande maioria das pacientes com Síndrome de Turner, a única alternativa é a fertilização *in vitro* com óvulos de dadores. Se for possível uma gravidez sem recurso a uma técnica RMA (Reprodução Medicamente Assistida), deve ser realizada uma avaliação minuciosa dos diversos sistemas, de forma a avaliar o risco potencial de complicações relacionadas com a gravidez. A vigilância durante este período inclui o tratamento da hipertensão, ecocardiogramas seriados e uma consulta de cardiologia. Se a paciente com Síndrome de Turner optar por RMA com doação de ovócitos, a avaliação do sistema cardiovascular e renal, a função da tiróide e a tolerância à glicose também deve ser sempre realizada. Se for observada uma malformação cardiovascular a gravidez poderá ser absolutamente contra-indicada. Mesmo após uma avaliação cardiovascular normal, as pacientes deverão ser avisadas do facto da gravidez poder ser de alto risco e da possibilidade da ocorrência de uma complicação cardíaca grave, capaz mesmo de levar à morte (Kavoussi *et al.*, 2006).

A taxa de gravidez por ciclo para pacientes com Síndrome de Turner por doação de óvulos é aproximadamente de 40%, valor semelhante ao de outras populações de pacientes que se submetem aos mesmos tratamentos de fertilidade. A taxa de abortamento entre as pacientes com Síndrome de Turner é, no entanto, mais elevada, com valores entre 40%-50%. Este facto deve-se essencialmente à existência de útero hipoplásico e possivelmente à diminuição da receptividade do endométrio (Kavoussi *et al.*, 2006).

A gravidez espontânea entre as mulheres com Síndrome de Turner é mencionada em cerca de 2% dos casos, nomeadamente nas situações de mosaico cromossómico, como a existência de linhas 45,X/46,XX, ou nos casos em que a função ovárica está preservada (Kavoussi *et al.*, 2006).

Um estudo observacional de gestações em pacientes com Síndrome de Turner demonstrou que seis delas resultaram em abortamento e oito em nados vivos. Contudo, metade dos nados vivos neste estudo apresentava malformações. Numa revisão da literatura realizada pelo mesmo grupo, de 160 gestações em 74 pacientes com Síndrome de Turner observou-se uma taxa de abortamento espontâneo de 29%, uma taxa de mortalidade

perinatal de 7%, uma taxa de malformação de 20% e o nascimento de bebês saudáveis em 38% dos casos. É assim de salientar a importância da vigilância fetal, nestas gestações de risco elevado (Tarani *et al.*, 1998).

Num estudo posterior, foram estudadas 410 pacientes dinamarquesas com Síndrome de Turner. Em 49% dos casos (200 pacientes) apresentavam cariótipo 45,X, 23% (95 pacientes) com mosaicismo e anomalias estruturais no segundo cromossoma X, 19% (78 pacientes) com mosaicismo 45,X/46,XX e 9% (37 pacientes) com a linha celular 46,XX e anomalias estruturais no segundo cromossoma X. Destas, apenas 31 mulheres (7,6%) obtiveram uma gravidez espontânea e 2 mulheres engravidaram por técnicas RMA, incluindo uma mulher 45,X que recorreu a doação de óvulos. É de referir que todas as gestações espontâneas foram obtidas somente em mulheres com cariótipo em mosaico, com presença obrigatória de uma linha celular 46,XX normal, juntamente com a linha celular 45,X ou uma linha com uma anomalia estrutural do segundo cromossomas X.

Destas gestações, nasceram 64 crianças em que 4 apresentavam alterações estruturais do segundo cromossoma X, e uma apresentava ambiguidade sexual (45,X/46,XY). As restantes 59 crianças apresentavam cariótipo normal (Birkebaek *et al.*, 2002).

Devido ao rápido desenvolvimento de novas tecnologias, poderá ser possível num futuro próximo, aumentar os valores de gestações espontâneas nas pacientes com Síndrome de Turner. Outra possibilidade futura inclui a criopreservação de ovócitos ou tecido ovárico. Além disso, há a possibilidade dos ovócitos poderem ser obtidos a partir de células estaminais localizados na medula óssea. Se assim for, as metodologias poderão ser utilizadas em várias subpopulações de doentes em risco de falência ovárica prematura, incluindo as pacientes com Síndrome de Turner (Kavoussi *et al.*, 2006).

1.2.2 Desenvolvimento psicomotor e comportamental

A maioria das pacientes com Síndrome de Turner têm uma inteligência normal e geralmente evidenciam bons progressos escolares. Na fase adulta, estas pacientes têm uma vida perfeitamente independente. No entanto, as estatísticas demonstram que aproximadamente 10% dos casos apresentam um certo grau de atraso intelectual, alterações na linguagem e em alguns casos é mesmo necessária ajuda no quotidiano. Nestas situações, a determinação do cariótipo é fundamental, uma vez que o risco de desenvolver atraso mental é 60-70% maior na presença de um cromossoma marcador ou 30% na presença de um cromossoma em anel (Otero, 1995).

Entre as pacientes com Síndrome de Turner e com inteligência normal são frequentes problemas na aprendizagem, concretamente no processamento de ideias, relação espaço-visão, distinção entre esquerda e direita e lentidão na execução de tarefas. Os problemas escolares podem aumentar quando associados a outras alterações, tais como no comportamento, hiperactividade e défice de atenção e concentração. As adolescentes com Síndrome de Turner podem apresentar alguns problemas de relacionamento com outros adolescentes devido à baixa integração social, resultante da sua baixa estatura e dificuldades intelectuais. Aproximadamente cerca de 10% das mulheres com Síndrome de Turner apresenta alterações psiquiátricas, tais como, anorexia nervosa, bulimia, transtorno bipolar, entre outros (Otero, 1995).

1.3 Perfil citogenético da Síndrome de Turner

Citogeneticamente, a Síndrome de Turner é caracterizada por uma monossomia do cromossoma X (45,X) em 45% dos casos (Wolff *et al.*, 2010).

Esta anomalia cromossómica pode surgir devido à não disjunção dos cromossomas sexuais durante a gametogénese de um dos progenitores ou resultar da perda de um dos cromossomas sexuais nas primeiras divisões mitóticas do zigoto. Em cerca de 75% dos casos 45,X, o cromossoma X é de origem materna, pelo que o erro de segregação cromossómica ocorre durante a meiose masculina ou já após a fertilização (Ferrão *et al.*, 2002) (Figura 5).

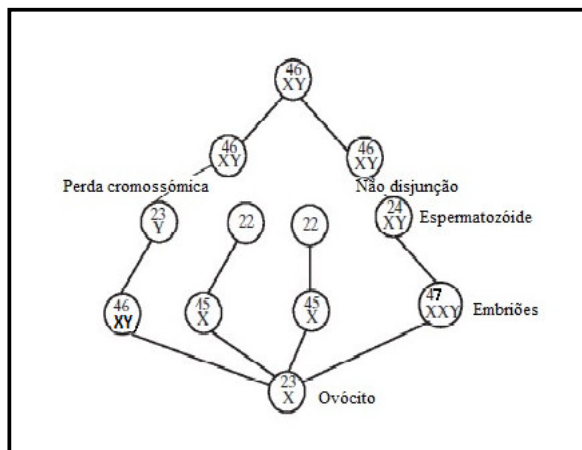


Figura 5: Mecanismo da produção da aneuploidia (adaptado de Otero, 1995).

Para além da monossomia do cromossoma X em estado puro (sem mosaicismo), é possível a presença de outras linhas celulares com dois ou mais cromossomas X (cariótipo em mosaico – Figura 6) ou cromossomas com anomalias estruturais. Estas anomalias estruturais do cromossoma X (isocromossoma do braço longo, cromossomas dicêntricos, deleções do braço curto ou cromossoma em anel) estão presentes em aproximadamente 30% dos casos.

Os mosaicos têm origem, habitualmente, numa não disjunção nas primeiras divisões do zigoto com dois ou mais clones celulares sobreviventes (Figura 6).

Entre 6 e 11% das pacientes com Síndrome de Turner apresentam mosaicismos que incluem uma linha celular que contém o cromossoma Y completo ou parte dele ou anomalias estruturais do cromossoma Y (isocromossoma do braço longo e cromossoma dicêntrico – Tabela 3) (Wolff *et al.*, 2010).

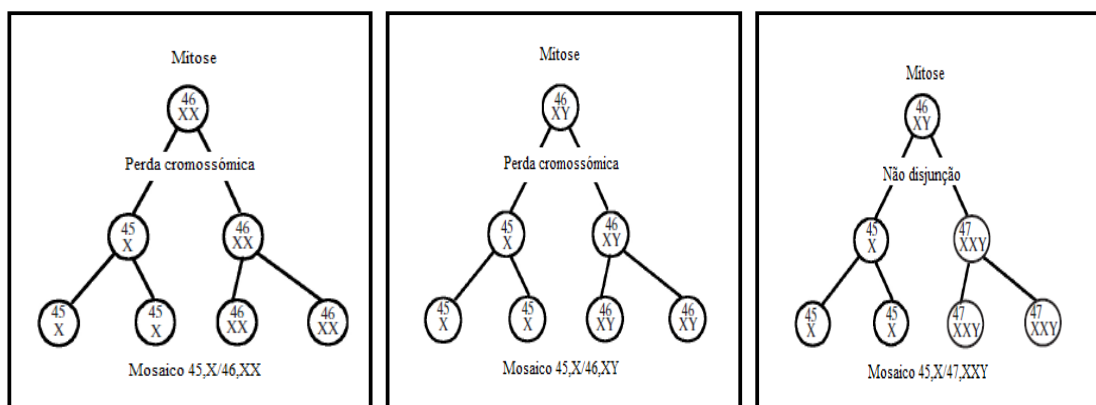


Figura 6: Esquematização dos diferentes tipos de mosaico (adaptado de Otero, 1995).

Factores tais como o aperfeiçoamento da análise cromossómica, a introdução de técnicas de bandeamento e o aumento do número de células analisadas, permitem reduzir a detecção de pacientes com cariótipo 45,X puro (apesar de ainda ser o mais frequente), ao contrário do número de pacientes que apresentam anomalias estruturais e diversos tipos de mosaicismos. Assim, pode afirmar-se que o aperfeiçoamento da análise cromossómica tem vindo a modificar o perfil citogenético da Síndrome de Turner.

Estes dados ajudam a reforçar a teoria, defendida por alguns autores, de que os fetos 45,X para sobreviverem necessitam de um segundo cromossoma sexual, ou seja, deverá existir em simultâneo uma linha celular normal em algum órgão ou tecido (Held *et al.*, 1992). Esta teoria é baseada em dois pontos principais: é estimado que aproximadamente 99% dos embriões com cariótipo 45,X puro morrem *in utero* e que a frequência de mosaicismo dos cromossomas sexuais é muito superior em recém-nascidos com Síndrome de Turner do que em produtos de abortamento (de Oliveira *et al.*, 2009).

Tabela 3: Diferentes cariótipos encontrados em pacientes com Síndrome de Turner (adaptado de Wolff *et al.*, 2010).

<i>Cariótipo</i>	<i>Percentagem de casos ST (%)</i>
45,X	45
46,X,i(X)(q10) ou 45,X	15-18
46,X,+mar ou +r ou 45,X	7-16
45,X/46,XX ou 45,X/47,XXX	7-16
46,X,del(Xp) ou 45,X	2-5
46,XY ou 46,X,del(Y) ou 46,X,r(Y) / 45,X	6-11
Outros	2-8

1.4 Diagnóstico na Síndrome de Turner

1.4.1 Diagnóstico Pré-Natal

Aproximadamente 1-2% das concepções apresentam um cariótipo 45,X. Estes fetos podem apresentar características ecográficas, tais como, translucência da nuca aumentada (Figura 7), higromas císticos volumosos, cardiopatias, coartacção da aorta, atraso no desenvolvimento e malformações renais. Para além disto, o rastreio bioquímico pode

apresentar níveis elevados de gonadotrofina coriônica humana e níveis baixos de alfa-fetoproteína conjugado com o estriol (Wolff *et al.*, 2010).

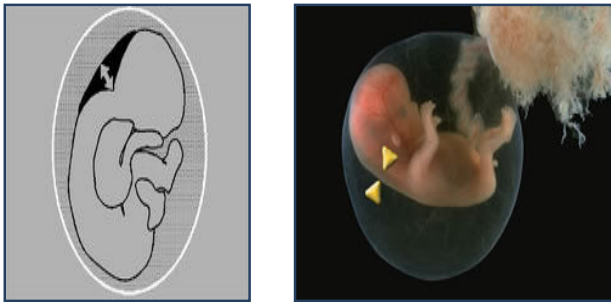


Figura 7: Feto com 11 semanas onde é visível uma acumulação de líquido na região da nuca (adaptado de <http://medstat.med.utah.edu/WebPath>).

Nestes casos, no diagnóstico citogenético pré-natal, realizado em líquido amniótico ou vilosidades coriônicas, pode observar-se um cariótipo consistente com a Síndrome de Turner. Contudo, é importante referir que o diagnóstico não deve limitar-se apenas a esta análise laboratorial. Na ausência de anomalias ecográficas, as meninas 45,X apresentam um fenótipo menos acentuado, com anomalias físicas menos graves quando comparadas com meninas diagnosticadas também através de anomalias ecográficas (Wolff *et al.*, 2010). No sentido de avaliar a presença de mosaïcismo é recomendado o estudo pós-natal em sangue periférico ou eventualmente noutros tecidos.

1.4.2 Diagnóstico Pós-Natal

Por norma, ao realizar um estudo citogenético em sangue periférico em pacientes com suspeita de Síndrome de Turner, devem ser analisadas 30 células. Desta forma, é possível detectar mosaïcismos com percentagens superiores a 10%, com um nível de confiança de 95% (Wiktor *et al.*, 2005). É importante referir que em situações de mosaïcismo de baixo grau a idade da mulher deve ser tida em consideração, de forma a garantir que a perda de um cromossoma X não está relacionada com a idade.

O estudo citogenético de um segundo tecido, por exemplo biópsia de pele ou esfregaço bucal, deve ser considerado em indivíduos com cariótipo 46,XX somente se houver uma elevada suspeita fenotípica de Síndrome de Turner. Para tal, deve ser utilizada a técnica de FISH em que são utilizadas sondas centroméricas para os cromossomas X e Y

e são analisadas cerca de 200 células em interfase (Wolff *et al.*, 2010). Estudos adicionais devem ser realizados sempre que um pequeno cromossoma marcador seja identificado.

O diagnóstico diferencial da Síndrome de Turner deve ter sempre em consideração os factores clínicos e os achados laboratoriais.

1.5 O cromossoma Y na Síndrome de Turner

Cerca de 5% das pacientes com Síndrome de Turner apresentam anomalias estruturais do cromossoma Y ou mosaicismos que incluem uma linha celular que contém o cromossoma Y completo ou parte dele (de Oliveira *et al.*, 2009).

O cromossoma Y humano representa 2% do genoma humano e tem aproximadamente 60Mb de comprimento. À semelhança dos cromossomas autossómicos e do cromossoma X, o cromossoma Y é composto por um braço curto (Yp) e um braço longo (Yq) separados por uma região centromérica essencial para a segregação do cromossoma. O braço curto e a região proximal do braço longo constituem a eucromatina, uma região composta por múltiplos genes activos. À heterocromatina, que compreende a região distal do braço longo do cromossoma Y (Yq12), não é atribuída a existência de genes, parecendo ser dispensável para a fertilidade masculina (Figura 8).

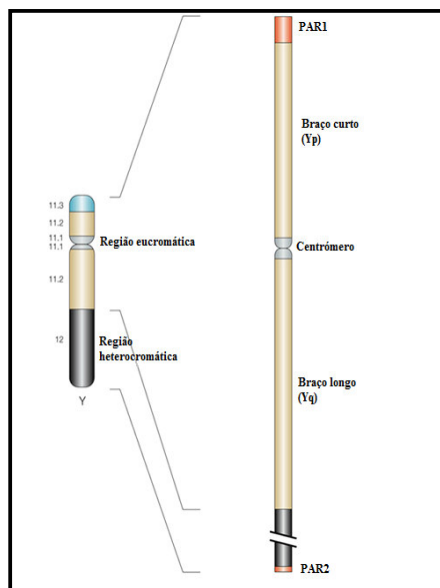


Figura 8: Estrutura do cromossoma Y (adaptado de Elliott et al., 1997).

Contém duas regiões pseudoautossômicas (PAR1 e PAR2), localizadas na região distal dos braços curto e longo do cromossoma. Estas regiões são homólogas com sequências do cromossoma X e são responsáveis pelo correcto emparelhamento entre os dois cromossomas sexuais durante a meiose masculina (Quintana-Murci *et al.*, 2001) (Figura 9).

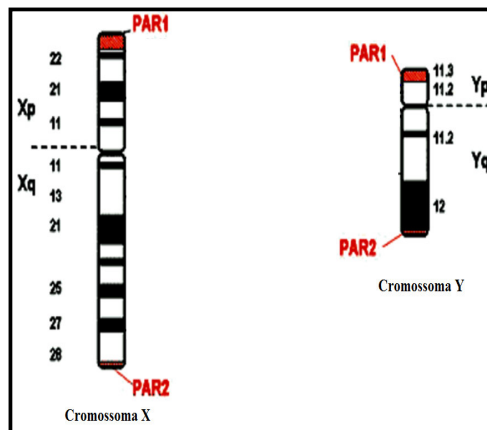


Figura 9: Esquema do cromossoma X e Y com indicação das regiões pseudoautossômicas PAR1 e PAR2 (adaptado de <http://www.endotext.org/pediatrics/pediatrics7/pediatricsframe7.htm>).

A restante porção do cromossoma Y, que compreende 95% do seu conteúdo, consiste num compartimento haplóide, onde não se verifica a recombinação génica.

Até à data, foram identificadas três funções independentes do cromossoma Y. Determinação do sexo – o gene *SRY* é um exemplar notável, fundamental para a diferenciação embrionária masculina; regulação da espermatogénese – a presença de deleções na porção eucromática distal do braço longo do cromossoma Y (Yq11.2) em pacientes com diagnóstico de infertilidade sugeriu a existência de um *locus* responsável pela espermatogénese, designado de factor de azoospermia (AZF); desenvolvimento de tumores gonadais.

Vários estudos têm demonstrado que os pacientes com disgenesia gonadal têm um risco aumentado (15-30%) de desenvolvimento de tumores, especialmente o tumor de células germinativas neoplásicas e células do estroma – gonadoblastoma (Deepak *et al.*, 2007).

Entre os pacientes com risco aumentado de desenvolvimento de gonadoblastoma estão aqueles com disgenesia gonadal pura, feminização testicular (ou síndrome de insensibilidade completa aos androgénios) e hermafroditismo verdadeiro (presença simultânea de tecido testicular e ovárico, separados ou em ovotestis, com ambiguidade

genital). Todos estes factores fazem com que a detecção do cromossoma Y em pacientes com Síndrome de Turner assuma uma importância clínica crucial.

Este cromossoma pode não ser detectado por análise citogenética convencional se for muito pequeno ou se existir em mosaico de muito baixo grau ($\leq 2\%$) (Patsalis *et al.*, 1998). É importante referir que aproximadamente metade dos cromossomas marcadores não identificados, que ocorrem com uma frequência estimada de 3%, são derivados do cromossoma Y (Bianco *et al.*, 2008). A detecção de linhas celulares com baixa representação e possíveis alterações estruturais é agora facilitada pela utilização de técnicas moleculares como o FISH e o PCR (Fernández *et al.*, 1996).

1.6 Gonadoblastoma

O gonadoblastoma é uma neoplasia composta por uma mistura de elementos gonadais, como células germinais primordiais de grandes dimensões, células de Sertoli imaturas ou células granulosas do cordão sexual e células do estroma gonadal.

Dados epidemiológicos mostram que o gonadoblastoma surge quase exclusivamente da disgenesia gonadal associada à presença do cromossoma Y ou fragmento deste. A frequência de gonadoblastoma nestes pacientes é de aproximadamente 30% (Su *et al.*, 2006).

O gonadoblastoma surge mais frequentemente em mulheres 46,XY com disgenesia gonadal, em indivíduos com intersexo e, em menor número, em pacientes com Síndrome de Turner que apresentem o cromossoma Y ou parte dele (Li *et al.*, 2007).

Aos indivíduos com risco aumentado de desenvolver gonadoblastoma é normalmente aconselhada a realização da gonadectomia profilática ou pelo menos o exame gonadal pela técnica de laparoscopia (Patsalis *et al.*, 1998).

Em 1987, foram propostos, por Verp e Simpson, dois modelos que explicavam a etiologia do gonadoblastoma: ou o tecido pouco diferenciado confere maior susceptibilidade à neoplasia, ou o defeito genético nos autossomas ou cromossoma X contribui para o desenvolvimento do tumor (Verp *et al.*, 1987). Estes dois modelos não prevaleceram e foram realizados outros estudos que demonstraram uma frequência elevada de gonadoblastoma em mulheres 46,XY. Este facto evidencia a relação entre o gonadoblastoma e a presença do cromossoma Y (Su *et al.*, 2006).

Com base nestes conhecimentos, foi postulada a existência no cromossoma Y de um locus designado GBY (*GonadoBlastoma locus on the Y chromosome*). Este locus (1-2Mb) encontra-se localizado numa pequena região que abrange o braço curto e braço longo proximal ao centrómero (Figura 10) (Su *et al.*, 2006).

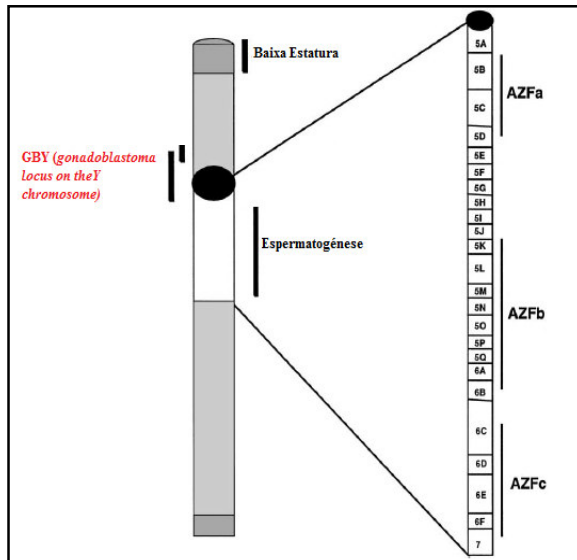


Figura 10: Representação esquemática do cromossoma Y com indicação da região GBY e das sub-divisões da região AZF associada a falhas na espermatogénese (adaptado de Quintana-Murci *et al.*, 2001).

De acordo com a sua localização, função e perfil de expressão, vários genes têm sido propostos como candidatos a GBY. Entre os genes localizados na região crítica para GBY, encontra-se o *TSPY* (*testis-specific protein Y-encoded*). Estudos recentes demonstraram que sequências do gene *TSPY* estão presentes no genoma de mulheres 46,XY e em indivíduos com intersexo, e estão abundantemente expressas neste tipo de tumores gonadais (Li *et al.*, 2007). Estes factos tornam o *TSPY* um forte candidato a gene para o GBY. Contudo, ainda não estão excluídos outros genes candidatos a GBY.

1.7 Sequências do cromossoma Y no gonadoblastoma

Várias anomalias moleculares e citogenéticas do cromossoma Y têm sido descritas e são associadas a características clínicas específicas. A perda de sequências do cromossoma Y na região AZF tem sido detectada em homens com azoospermia ou oligozoospermia severa. Outras anomalias do cromossoma Y detectadas por citogenética têm sido descritas, normalmente associadas à linha celular 45,X (Patsalis *et al.*, 2005).

Delecções em AZF (interval 5A-7) têm sido identificadas em casos de mosaicismos dos cromossomas sexuais com uma frequência de 47%, quando comparado com os 10-12% das delecções em AZF (Figura 10) encontrados em homens 46,XY com infertilidade idiopática. Estes valores indicam que delecções do braço longo do cromossoma Y estão fortemente associados aos mosaicismos sexuais (Patsalis *et al.*, 2005).

Assim e tendo em conta que o gonadoblastoma surge quase exclusivamente da disgenesia gonadal associada à presença do cromossoma Y ou a fragmentos deste, é importante analisar a presença de alguns genes presentes no cromossoma Y.

As sequências mais frequentemente pesquisadas são as do *SRY* (*sex determining region on the Y chromosome*) e o *TSPY* (*testis-specific protein, Y-encoded*).

O *SRY* é um dos genes mais investigados e a sua detecção é considerada de grande importância nos estudos sobre mosaicismo na Síndrome de Turner (Bianco *et al.*, 2009).

O gene *SRY* é utilizado como referência tendo em conta a sua localização e o importante papel na cascata de sinalização na determinação do sexo. Este gene tem ainda muita importância na diferenciação celular e consequentemente na determinação do microambiente gonadal (de Oliveira *et al.*, 2009).

O *TSPY* é um gene repetido em *tandem*, localizado no braço curto do cromossoma Y. A maioria das unidades com transcrições funcionais foram mapeadas na região crítica do *locus* do gonadoblastoma no cromossoma Y (*GBY*), o único *locus* oncogénico específico do cromossoma masculino (Li *et al.*, 2007).

Para além dos genes *SRY* e *TSPY* existem outros que também estão presentes na região AZF do cromossoma Y humano e que desempenham um papel fundamental.

Durante o projecto de mapeamento do genoma humano foi identificado na região AZF mais um gene candidato a factor de azoospermia (Skaletsky *et al.*, 2003). O gene *HSFY* (*heat shock transcription factor, Y chromosome*) está localizado na região AZFb e possui um domínio de ligação ao DNA, semelhante ao *HSF* (*heat shock factor*) que regula a expressão de HSPs (*heat shock proteins*).

A proteína HSFY está predominantemente expressa no testículo humano. No entanto, alguns estudos realizados indicam que esta proteína tem localizações subcelulares distintas, dependendo do estadio da espermatogénese. Este facto indicia que a modulação da expressão da proteína HSFY tem alguma responsabilidade na espermatogénese (Shinka *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2006).

O gene *DDX3Y* (*DEAD/H box polypeptide, Y-chromosome*) é um dos dois genes mapeados na parte proximal do braço longo do cromossoma Y. O seu homólogo funcional no cromossoma X (*DDX3X*) foi mapeado na região proximal do braço curto (Rauschendorf *et al.*, 2010). O gene *DDX3Y* tem sido referenciado como o principal gene funcional para a fertilidade masculina, na região AZFa, uma vez que a sua deleção foi detectada em homens com a Síndrome SCOS (*Sertoli-cell-only-syndrome*). Contudo, estas deleções não foram confirmadas por métodos de sequenciação e ainda não foram descritas noutros estudos semelhantes (Rauschendorf *et al.*, 2010).

Neste estudo foram incluídos os genes anteriormente referidos (*SRY*, *TSPY*, *DDX3Y* e *HSFY*) de forma a detectar genes mapeados em diferentes regiões do cromossoma Y.

1.8 Métodos de análise alternativos

1.8.1 FISH - *Fluorescence In-Situ Hybridization*

Nos anos 70, a técnica de Hibridação *In-Situ*, veio juntar-se à citogenética convencional, complementando-a e permitindo a detecção rápida de anomalias cromossómicas numéricas (Schmidt *et al.*, 2000). Esta técnica, inicialmente denominada de Hibridação *In-Situ* Isotópica (HIS), utiliza sondas de ácidos nucleicos marcadas com moléculas radioactivas e detectadas, após hibridação, por autoradiografia (Pardue *et al.*, 1969). Em 1990, as moléculas fluorescentes vieram substituir as radioactivas, surgindo assim a FISH - *Fluorescence In-Situ Hybridization* - em que o DNA humano é inserido em diferentes vectores, como plasmídeos, cosmídeos, *bacterial artificial chromosomes* (BAC's), *Pl-derived artificial chromosomes* (PAC's) e *yeast artificial chromosomes* (YAC's), marcados com uma molécula fluorescente e usados como sonda para hibridar com regiões específicas dos diferentes cromossomas (Shaffer *et al.*, 2004).

O método de marcação das sondas de DNA pode ser directo ou indirecto. A marcação directa pressupõe a ligação de um fluorocromo à sonda de DNA que, imediatamente após a sua ligação à sequência de DNA complementar da amostra, permite a visualização do sinal fluorescente (Murthy *et al.*, 2006). A marcação indirecta requer a modificação da sonda pela adição de anticorpos, sendo os mais comuns a biotina-avidina e a digoxigenina. Os fluorocromos permitem a identificação das sequências complementares pela emissão de sinais fluorescentes, visualizados através de um microscópio de fluorescência (Verma *et al.*, 1995).

Na FISH, podem ser usadas diferentes tipos de sondas: sequência única, α -satélite, sub-teloméricas e sondas de pintura cromossómica (Shaffer *et al.*, 2004). A combinação de fluorocromos origina múltiplas cores, o que permite a identificação de todos os 24 cromossomas humanos, cada um deles marcado com um fluorocromo de cor diferente, numa só hibridação, constituindo o Multicolor FISH (m-FISH) (Thilaganathan *et al.*, 2000). Assim, a m-FISH, passou a ser utilizada na caracterização de determinados rearranjos cromossómicos e cromossomas marcadores.

Este procedimento é dispendioso e laborioso, principalmente no que se refere à análise microscópica, dado que envolve a contagem de um grande número de células,

núcleos interfásicos ou metafases (50-100 células) relativamente a células de amostras controlo, com o objectivo de determinar taxas de falsos positivos e falsos negativos, e eventuais mosaicismos (Mann *et al.*, 2004).

A capacidade de resolução da técnica acima referida é limitada a cerca de 4-10 Mb em cromossomas metafásicos (400 a 500 bandas, aproximadamente), podendo ser na ordem dos 50 Kb para cromossomas interfásicos. Contudo, a especificidade da FISH interfásica pode apresentar-se diminuída em amniócitos não cultivados devido ao *background* inespecífico e à ligação não específica das sondas fluorescentes ao citoesqueleto (Yoon *et al.*, 2002).

A FISH permite a obtenção de resultados ao fim de 24-48 horas, o que reduz significativamente o tempo de espera de um resultado (Pergament *et al.*, 2000).

A aplicação da FISH, dada a sua rapidez, sensibilidade e especificidade, tem-se relevado um método complementar à citogenética convencional, sendo por vezes indispensável em casos em que a resolução do cariótipo não permite detectar pequenas alterações (ex: Síndrome de Microdelecção) ou quando não é possível obter metafases para analisar.

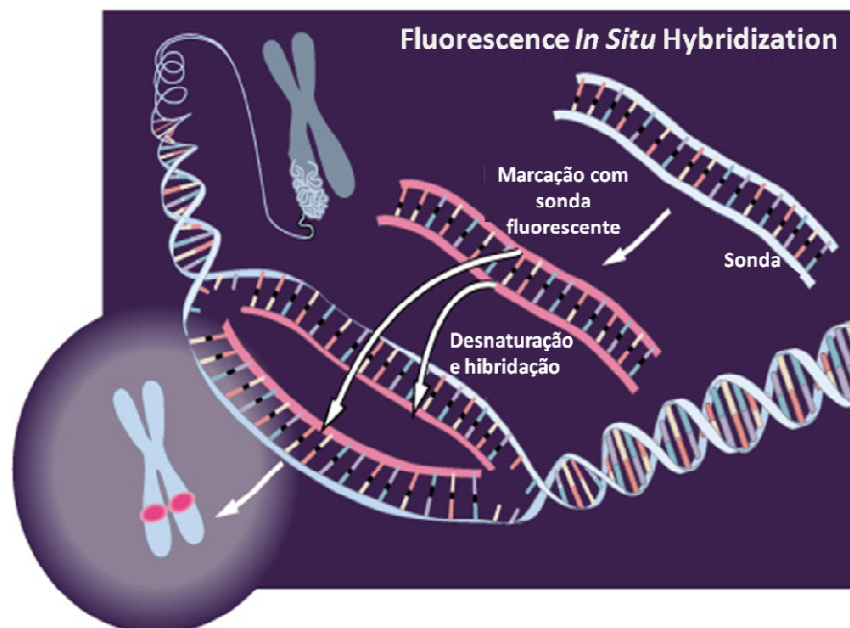


Figura 11: Técnica de FISH (adaptado de <http://www.genome.gov>).

1.8.2 PCR - *Polymerase Chain Reaction*

A PCR foi descrita pela primeira vez por Kary Mullis, em 1985 (Saiki *et al.*, 1985). Esta técnica baseia-se na amplificação enzimática, *in vitro*, de um fragmento de DNA, simulando o processo de replicação que ocorre *in vivo*. O potencial desta técnica deve-se à capacidade de amplificar em pouco tempo grandes quantidades de um fragmento de DNA específico.

Para realizar um PCR é necessário dispor de DNA, de “primers” ou iniciadores, ou seja, de sequências oligonucleotídicas (com cerca de 20bp) complementares às sequências que na direcção 5’-3’ e 3’-5’ flanqueiam a região a amplificar e que servem para iniciar a polimerização, efectuada por uma polimerase do DNA, estável a temperaturas elevadas (cerca de 94°C), *Taq* DNA polimerase obtida a partir de uma bactéria termófila (*Thermus aquaticus*), dos quatro nucleótidos que integram o DNA (A,T,C e G) e de um aparelho (termociclador) que permita fazer variar de uma forma rápida mas rigorosa o tempo e a temperatura ao longo das três etapas que constituem um ciclo de amplificação (Figura 12).

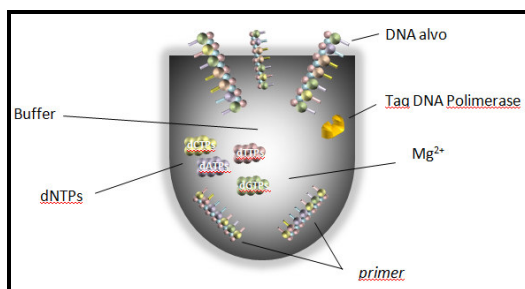


Figura 12: Elementos necessários para a realização de um PCR.

A amplificação exponencial da sequência localizada entre os dois *primers* é conseguida após vários ciclos (25 a 40).

Cada ciclo é constituído por três etapas (Figura 13):

1. Desnaturação do DNA ($\pm 95^{\circ}\text{C}$) – a dupla cadeia de DNA é separada pela acção da temperatura;
2. Hibridação dos *primers*, “annealing,” – emparelhamento dos *primers* com as regiões complementares. A temperatura a que ocorre o “annealing” entre os *primers* e a cadeia molde depende do tamanho e da sequência do *primer*, podendo variar entre os 50 e os 70°C.

3. Extensão, polimerização efectuada pela *Taq polimerase* ($\pm 72^{\circ}\text{C}$) – a DNA polimerase liga-se ao DNA em cadeia dupla, constituído pelo *primer* e a zona complementar onde este se ligou na etapa anterior e usa desoxinucleotídeos trifosfatos (d’NTPs - dATP, dTTP, dGTP e dCTP) para sintetizar uma nova cadeia na direcção 5’ - 3’.

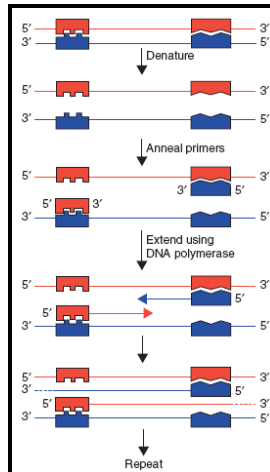


Figura 13: Esquemática das três etapas que constituem um ciclo da técnica de PCR.

São vários os factores a ter em consideração quando se pretende amplificar uma sequência específica de DNA, uma vez que a PCR possui características qualitativas, nomeadamente especificidade, eficiência, sensibilidade e fidelidade.

Assim deve ter-se em consideração:

- Características e concentração dos *primers*

Os *primers* devem ter entre 18 e 24 nucleotídeos, 50 a 60% de teor de GC e uma temperatura de fusão (T_m) semelhante (T_m pode ser calculado pela fórmula $T_m = 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T})+4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C})$). Deve-se também evitar, que os *primers* estejam localizados em sequências palindrómicas, conjuntos de mais de 3G ou C junto à extremidade 3’ e sequências complementares entre os *primers* (que levarão à formação de dímeros). Os *primers* devem estar a uma concentração final na reacção de 0,1 a 0,5 μM , pois concentrações superiores favorecem o emparelhamento não específico e a formação de dímeros de *primers*.

- Ciclo de temperaturas

A temperatura a que ocorre a etapa de desnaturação varia de acordo com a amostra, podendo variar de 90°C a 95°C, dependendo do teor de GC. Em relação à temperatura de hibridação dos *primers* esta deve ser 5°C inferior ao Tm. Temperaturas mais elevadas nesta etapa vão levar a um aumento na restringência e também na especificidade da reacção de PCR. Contudo as temperaturas a usar não devem ser demasiado elevadas uma vez que pode não ocorrer *annealing* e consequentemente não ocorrer amplificação. Relativamente à etapa de extensão, a temperatura depende da polimerase de DNA utilizada. A mais utilizada é a *Taq* polimerase produzida pela bactéria termofílica *Thermus aquaticus*. Esta *Taq* DNA polimerase é resistente a elevadas temperaturas. Desta forma, pode suportar temperaturas de ~95°C utilizadas na etapa de desnaturação, mantendo-se estável e mantendo a sua actividade. Além disso, como esta possui uma temperatura óptima de 72°C para a sua actividade polimerásica, a etapa de extensão não compromete a especificidade de “annealing” do *primer*.

- Características do tampão

A concentração de iões de Magnésio (Mg^{2+}) na reacção é relevante para o sucesso desta, uma vez que a concentração influencia a actividade e a fidelidade da enzima, bem como a especificidade da reacção. A baixas concentrações de Mg^{2+} o nível de actividade é menor e a fidelidade superior, há maior especificidade, enquanto que a concentrações elevadas a reacção perde especificidade, podendo obter-se produtos inespecíficos. A fidelidade diminui assim como a especificidade. Desta forma, torna-se necessário determinar a concentração óptima de magnésio, para cada reacção. Esta é determinada empiricamente e separadamente para cada conjunto de *primers* (normalmente encontra-se entre 1-5mM).

- pH

O valor do pH desempenha também um papel determinante no sucesso da reacção. O pH na maioria das reacções de amplificação é de 8,4. Quando se pretende amplificar fragmentos mais longos deve utilizar-se um pH superior, dado que durante a reacção o valor de pH tende a diminuir com as temperaturas elevadas, e uma diminuição excessiva pode levar a uma menor amplificação.

1.8.3 Electroforese capilar

O novo sistema de electroforese capilar, o QIAxcel (Qiagen, Hilden) e o respectivo *kit* (QIAxcel DNA Screening Kit) (Qiagen, Hilden) permitem uma separação rápida de fragmentos de ácidos nucleicos (Figura 14).

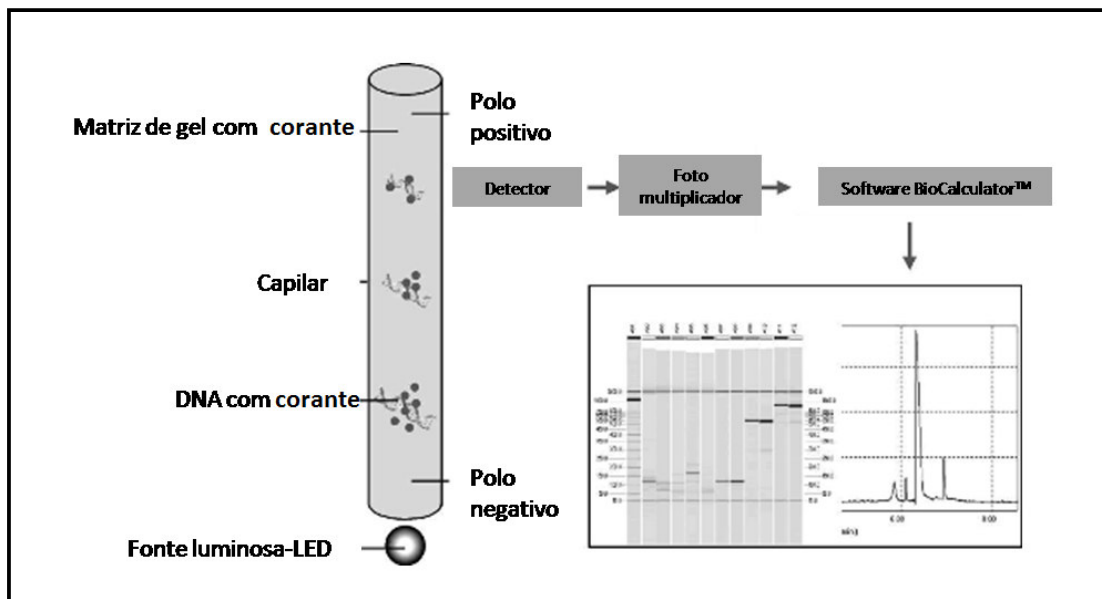


Figura 14: Esquema do funcionamento do sistema QIAxcel (adaptado de <http://www.qiagen.com/Products/QIAxcelDNAkits.asp>).

Ao contrário da electroforese em gel de agarose, este sistema utiliza um cartucho que contém 12 capilares. As amostras são aspiradas individualmente para os capilares de forma automática e é aplicada uma voltagem fixa. O DNA carregado negativamente, migra ao longo do capilar até ao pólo positivo. Assim, como no gel de agarose, as moléculas de menor peso molecular migram mais depressa que as moléculas de maior peso molecular. Dentro do capilar existe uma matriz com um corante que se liga às moléculas de DNA ou RNA. À medida que as amostras migram ao longo do capilar, passam por um detector que detecta e mede a intensidade de fluorescência emitida pelo corante ligado às moléculas de ácidos nucleicos. Um fotomultiplicador converte o sinal de fluorescência num impulso eléctrico que é depois transferido para um computador e processado pelo *software* BioCalculator™ (Qiagen, Hilden). Depois do processamento os dados são mostrados num electroforograma ou numa imagem virtual de um gel.

2. Objectivos

Citogeneticamente, a Síndrome de Turner é caracterizada por uma monossomia do cromossoma X (45,X). Esta patologia afecta aproximadamente 1 em cada 2500 nados vivos femininos (Wolff *et al.*, 2010). Para além da monossomia do cromossoma X, têm sido detectadas, com alguma frequência, outras linhas celulares com dois ou mais cromossomas X ou cromossomas com anomalias estruturais. Cerca de 5% das pacientes com Síndrome de Turner apresentam anomalias estruturais do cromossoma Y ou mosaicismos que incluem uma linha celular que contém o cromossoma Y completo ou parte dele (de Oliveira *et al.*, 2009). Este cromossoma (ou parte dele) pode não ser detectado por análise citogenética convencional se for muito pequeno ou se existir em mosaico de muito baixo grau.

Dados epidemiológicos mostram que o gonadoblastoma surge quase exclusivamente em casos de disgenesia gonadal associada à presença do cromossoma Y ou fragmento deste.

É ainda controversa a questão relativa à frequência de material derivado do cromossoma Y em pacientes com Síndrome de Turner e à probabilidade de ocorrência de gonadoblastoma nestes.

A partir dos pressupostos já referidos, os objectivos foram os seguintes:

- Determinar a presença de genes mapeados no cromossoma Y em indivíduos com Síndrome de Turner;
- Avaliar a importância de um teste molecular para a detecção de sequências do cromossoma Y, não observadas por citogenética convencional.

3. Material e Métodos

3.1 Amostra

Foram estudados 107 pacientes com Síndrome de Turner, analisados no Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Neste estudo foram incluídas amostras de sangue periférico de 83 indivíduos, 5 amostras de líquido amniótico obtidas por DPN (diagnóstico pré-natal) e 19 amostras de produtos de abortamento. As indicações para estudo pós-natal incluíram as alterações mais comuns associadas a esta síndrome (baixa estatura, amenorreia primária, má evolução pubertária, infertilidade, entre outros) e para o estudo pré-natal as alterações mais comuns foram translucência da nuca aumentada, rastreio bioquímico positivo e atraso no desenvolvimento.

3.2 Análise citogenética

A análise citogenética foi efectuada com bandas GTL de alta resolução, obtidas a partir de culturas (48-72h), sincronizadas de linfócitos de sangue periférico e a partir de culturas de fibroblastos de líquido amniótico e produtos de abortamento. Em média, foram analisadas cerca de 15-30 metafases por caso, tendo em conta os critérios definidos.

3.2.1 Sangue periférico - cultura e preparação de lâminas – procedimento

- Adicionaram-se a cada frasco de cultura, devidamente identificado, 9ml de meio completo e 0,5ml < 1 ano; 1ml > 1 ano de sangue total. Homogeneizou-se o conteúdo.
- Incubaram-se as culturas durante 48 ou 72 horas na estufa a 37°C.
- Após as 48 ou 72 horas de cultura, adicionou-se a cada frasco 40µl da solução de metotrexato. Homogeneizou-se o conteúdo.
- Incubaram-se as culturas na estufa a 37°C, durante 16h30min.

- Após as 16h30min de cultura, homogeneizou-se e passou-se o conteúdo dos frascos para tubos de cultura e centrifugou-se a 1600 rpm durante 6min, à temperatura ambiente. Rejeitou-se o sobrenadante (SN).
- Adicionou-se 6ml de meio de cultura completo (sem PHA) e 120µl de timidina. Homogeneizou-se.
- Incubaram-se durante 4h45m, na estufa a 37°C.
- Adicionou-se 120µl de Colcemid® e incubaram-se durante 15min, a 37°C.
- Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e centrifugou-se durante 6min a 1600 rpm, à temperatura ambiente. Rejeitou-se o SN.
- Adicionou-se pouco a pouco, homogeneizando-se, o soluto hipotónico (2,25gr de KCL + 500ml de água destilada), previamente aquecido a 37°C. Homogeneizou-se e deixou-se actuar durante 10min, à temperatura ambiente.
- Centrifugou-se durante 6min a 1600 rpm, à temperatura ambiente. Rejeitou-se o SN.
- Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e adicionou-se solução de Ibraimov (92ml de água destilada + 5ml ácido acético + 3ml de metanol) até $\frac{3}{4}$ do tubo de cultura.
- Centrifugou-se durante 6min a 1600 rpm, à temperatura ambiente. Rejeitou-se o SN e ressuspendeu-se o sedimento em metanol até $\frac{3}{4}$ do tubo.
- Centrifugou-se durante 6min a 1600 rpm, à temperatura ambiente. Rejeitou-se o SN e ressuspendeu-se, o sedimento em 5ml de fixador frio (Metanol absoluto:3 – Ácido acético:1), gota-a-gota, concluindo-se assim a fixação do material biológico. Homogeneizou-se.
- Centrifugou-se durante 6min a 1600 rpm, à temperatura ambiente. Rejeitou-se o SN e ressuspendeu-se o sedimento em fixador. Centrifugou-se e repetiu-se este passo 2 a 3 vezes.

3.2.2 Produtos de abortamento – cultura de fibroblastos e preparação de lâminas – procedimento

- Colheu-se o tecido em meio de cultura para fibroblastos ou em RPMI[®] com antibióticos.
- Colocou-se o tecido numa placa estéril e lavou-se com PBS utilizando-se uma pipeta de Pasteur estéril. Visualizou-se à lupa e separou-se vilosidades ou membrana retirando os coágulos. Nos tecidos (pele ou calcâneo) lavou-se várias vezes com PBS tentando retirar todo o sangue presente. Cortou-se o tecido em fragmentos muito pequenos e adicionou-se colagenase. Manteve-se na estufa a 37°C durante 4h.
- Mudou-se para tubo, adicionou-se RPMI[®] e centrifugou-se (durante 6min. a 1600 rpm).
- Rejeitou-se todo o SN com uma pipeta de Pasteur estéril. Dividiu-se o sedimento de forma proporcional ao nº de culturas que se realizou – cultura 1 e 2 em frasco (5ml de meio) e cultura *in situ* (0,5ml de meio).
- Incubou-se numa estufa de CO₂ (5%), à temperatura de 37°C.
- Após 3-5 dias de cultura, observou-se a densidade celular ao microscópio e substituiu-se o meio de cultura. Quando se verificou crescimento celular suficiente, adicionou-se 60µl de Colcemid[®] e incubou-se a 37°C durante 2h30m.
- Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 4,6ml da solução de Tripsina/PBS/EDTA (20mg Tripsina + 50mL PBS + 0,3mL EDTA), previamente aquecida a 37°C. Incubou-se na estufa durante 10min.
- Adicionou-se 6,6ml de água destilada (solução hipotónica), previamente aquecida a 37°C. Transferiu-se a solução para um tubo e centrifugou-se a 1600rpm durante 6min.
- Retirou-se o sobrenadante, homogeneizou-se o conteúdo do tubo e adicionou-se fixador frio (Metanol absoluto:3 – Ácido acético:1) lentamente agitando sempre (fixação gota-a-gota) até cerca de ¾ do volume do tubo. Homogeneizou-se.

- Centrifugou-se e repetiram-se os 2 passos anteriores 2 a 3 vezes e guardou-se o tubo a -20°C até utilização posterior.

3.2.3 Líquido amniótico – cultura de fibroblastos e preparação de lâminas – procedimento

- Na câmara de fluxo, passou-se o conteúdo da seringa para um tubo cónico, devidamente identificado.
- Centrifugou-se o líquido amniótico ($\pm 10\text{ml}$) a 1600rpm durante 6min.
- Novamente na câmara de fluxo, rejeitou-se o SN quase na totalidade e dividiu-se o sedimento, devidamente homogeneizado, por dois frascos.
- Adicionou-se 5ml de meio de cultura a cada um dos dois frascos.
- Incubou-se numa estufa de CO_2 (5%), à temperatura de 37°C .
- Após 5 dias de cultura, observou-se a densidade celular ao microscópio e substituiu-se o meio de cultura. Quando se verificou crescimento celular suficiente, adicionou-se $60\mu\text{l}$ de Colcemid[®] e incubou-se a 37°C durante 2h30m.
- Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 4,6ml da solução de Tripsina/PBS/EDTA (20mg Tripsina + 50mL PBS + 0,3mL EDTA), previamente aquecida a 37°C . Incubou-se na estufa durante 10min.
- Adicionou-se 6,6ml de água destilada (solução hipotónica), previamente aquecida a 37°C . Transferiu-se a solução para um tubo e centrifugou-se a 1600rpm durante 6min.
- Retirou-se o sobrenadante, homogeneizou-se o conteúdo do tubo e adicionou-se fixador frio (Metanol absoluto:3 – Ácido acético:1) lentamente agitando sempre (fixação gota-a-gota) até cerca de $\frac{3}{4}$ do volume do tubo. Homogeneizou-se.
- Centrifugou-se e repetiram-se os 2 passos anteriores 2 a 3 vezes e guardou-se o tubo a -20°C até utilização posterior.

3.2.3.1 Extensão de lâminas – procedimento

- Lavaram-se as lâminas em metanol e criaram-se as condições necessárias à extensão: temperatura entre 22-23°C, e humidade 42%-43%.
- Bafejou-se a lâmina e deixou-se cair uma gota de suspensão celular.
- Colocou-se a lâmina na vertical para escorrer o excesso de fixador, e deixou-se a lâmina secar horizontalmente sobre a bancada durante cerca de 5 minutos.
- Procedeu-se ao envelhecimento das lâminas 90°C, durante 1h05m.

3.2.3.2 Bandeamento de bandas GTL (coloração de Leishman) – procedimento

- A lâmina depois de envelhecida e arrefecida foi colocada numa solução de peridrol (50mL H₂O₂ + 150mL água destilada), durante 5 minutos.
- Retirou-se a lâmina, lavou-se em metanol e deixou-se secar horizontalmente sobre uma folha de papel.
- As lâminas secas foram então mergulhadas em solução de tripsina (120mg Tripsina + 100mL tampão Sorensen) durante 6 segundos, e foram lavadas imediatamente em tampão Sorensen (9,47g Na₂HPO₄ + 9,073g KH₂PO₄ + 1L água destilada). Escorreu-se e sacudiu-se a lâmina.
- Colocou-se a lâmina horizontalmente sobre o suporte e cobriu-se completamente a lâmina com corante Leishman, deixando o corante actuar durante 3 minutos.
- Escorreu-se e lavou-se a lâmina imediatamente em tampão GURR (1 pastilha de *Gurr's Buffer* + 1L água destilada).
- Passou-se a lâmina por água corrente, e deixou-se secar ao ar em posição inclinada.
- Posteriormente, as lâminas foram observadas e analisadas através de um microscópio Nikon (Eclipse, E-400; Tóquio, Japão) com uma câmara

CCD (Sony, Tóquio, Japão), e *software* apropriado (Cytovision Ultra, Applied Imaging International, Sunderland, UK).

3.3 Análise Molecular

3.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA genómico das amostras do sangue periférico foi realizado a partir de células fixadas em metanol:ácido acético, tendo-se utilizado um *kit* comercial de extração de DNA (Blood & Cell Culture DNA Spin Kit/250 - Genomed).

Para a extração de DNA das amostras do líquido amniótico e dos produtos de abortamento utilizou-se um kit comercial de purificação de DNA (ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System - Promega Corporation, Madison USA).

3.3.1.1 Extração de DNA (sangue periférico) – procedimento

- Colocaram-se os tubos com as células em fixador a centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- Removeu-se o SN e adicionou-se 500µL de PBS – vortex.
- Centrifugou-se a 14.000 rpm durante 3 minutos.
- Rejeitou-se o SN e adicionou-se novamente 500µL de PBS, 20 µL de *protease K* e 500µL de *Buffer K1* – vortex.
- Incubou-se durante 10 minutos a 58°C.
- Adicionou-se 500µL de etanol absoluto – vortex.
- Transferiram-se 800µL da *mix* anterior para uma coluna JETQUICK micro-spin.
- Centrifugou-se a 10.600 rpm durante 1 minuto.
- Rejeitou-se o SN e voltou-se a transferir 800µL da *mix* para a coluna JETQUICK micro-spin.
- Centrifugou-se a 10.600 rpm durante 1 minuto.
- Rejeitou-se o SN e adicionou-se 500µL de *Buffer KX*.

- Centrifugou-se a 10.600 rpm durante 1 minuto.
- Rejeitou-se o SN e adicionou-se 500µL de *Buffer K2*.
- Centrifugou-se a 10.600 rpm durante 1 minuto.
- Rejeitou-se o SN e voltou-se a centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.
- Transferiu-se a JETQUICK micro-spin para um tubo de 1.5mL e adicionou-se 50µL de *TrisHCl*.
- Incubou-se a JETQUICK micro-spin durante 2 minutos, à temperatura ambiente.
- Centrifugou-se a 10.600 rpm durante 2 minutos.
- Guardou-se o DNA a 4°C até utilização posterior.

3.3.1.2 Extracção de DNA (produtos de abortamento e líquidos amnióticos) – procedimento

- Centrifugou-se de 2 ml de sobrenadante de cultura numa microcentrífuga a 14000 rpm durante 10 minutos, 20°C;
- Removeu-se o sobrenadante;
- Adicionou-se 60-200 µl de resina (ReadyAmp™ Genomic DNA Purification Resin) ao sedimento celular, dependendo do seu tamanho, sob agitação;
- Ressuspendeu-se o pellet no vortex durante 5-10 segundos;
- Incubou-se a amostra durante 20 minutos a 56°C no banho-maria;
- Ressuspendeu-se o pellet no vortex durante 5-10 segundos;
- Incubou-se durante 8 minutos a 100°C no banho-maria;
- Ressuspendeu-se o pellet no vortex durante 5-10 segundos;
- Centrifugou-se a amostra durante 2 minutos a 14000 rpm, 20°C;
- Após este processo o ssDNA encontrava-se no sobrenadante e podia ser utilizado em reacções de PCR ou ser armazenado a 4°C ou -20°C.

3.3.1.3 PCR – Análise da integridade do DNA

Após a extracção de DNA e tendo como objectivo verificar a integridade do DNA, foi realizada uma reacção de PCR para o gene da amelogenina (*AMXY*).

A mistura de reacção é apresentada na Tabela 4, de acordo com os pares de *primers* utilizados na Tabela 8. A reacção decorreu com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de 48 segundos a 94°C, 48 segundos a 58°C e 1 minuto a 72°C, com uma extensão final de 30 minutos a 72°C.

Tabela 4: Mistura de reacção para a reacção de PCR do gene *AMXY*.

Componentes	Mistura para 1 reacção
H ₂ O (B/Braun)	15,75 µl
<i>PCR Gold Buffer</i> (Applied Biosystems®)	2,5 µl
Mg ₂ SO ₄ (1,75M Applied Biosystems®)	1,75 µl
<i>dNTP's</i> (Mix)	1,5 µl
Mix de Primers (10pmol/ µl)	0,2 µl
Amplitaq Gold TM (Applied Biosystems®)	0,3 µl
DNA	3 µl

3.3.2 PCR – Caracterização molecular das sequências do cromossoma Y

No presente estudo foram realizadas quatro reacções de PCR diferentes com o objectivo de determinar a presença de quatro genes distintos.

3.3.2.1 PCR SRY

A mistura de reacção é apresentada na Tabela 5, de acordo com o par de *primers* respectivo (Tabela 6).

A reacção decorreu com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 5: Mistura de reacção para as reacções de PCR dos genes *SRY*.

Componentes	Mistura para 1 reacção
H ₂ O (B/Braun)	17,2 µl
<i>PCR Gold Buffer</i> (Applied Biosystems®)	2,5 µl
MgCl ₂ (Solution 1,75M Applied Biosystems®)	1 µl
<i>dNTP's</i> (2,5mM Mix)	0,5 µl
Mix de Primers (25µmol/ µl)	0,5 µl
Amplitaq Gold TM (Applied Biosystems®)	0,3 µl
DNA	3 µl

Tabela 6: Sequências dos *primers* utilizados nas quatro reacções de PCR e respectivas temperaturas de *annealing*.

Gene	Sequência de <i>Primers</i> (5'→3')		Tamanho do produto (pb)	Temperatura de <i>annealing</i>
<i>AMXY</i>	F <i>AMXY</i>	5'-6-FAM-CTG ATG GTT GGC CTC AAG CCT-3'	432	58°C
	R <i>AMXY</i>	5'-GGT GGC GGC TGT TGC TGC TG-3'		
<i>SRY</i>	F <i>sY14</i>	5'-GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA-3'	472	60°C
	R <i>sY14</i>	5'-GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3'		
<i>TSPY</i>	F <i>TSPY</i>	5'-CCT TTC ATC CCA ACC TTT ATT TCC A-3'	273	62°C
	R <i>TSPY</i>	5'-GCA GTC ATG TTC AGC CAA ACA GC-3'		
<i>DDX3Y</i>	F <i>DBY</i>	5'-ATC GAC AAA GTA GTG GTT CC-3'	688	58°C
	R <i>DBY</i>	5'-AGA TTC AGT TGC CCC ACC AG-3'		
<i>HSFY</i>	F <i>sY114</i>	5'-TGC ACT CAT GGA GAC AAC AG-3'	1450	60°C
	R <i>sY114</i>	5'-AAC CAG GGT TTT CAC TGA AA-3'		

3.3.2.2 PCR TSPY

Uma vez que não foi possível otimizar as condições de PCR para amplificação isolada deste marcador, utilizou-se o protocolo de rotina do diagnóstico, que consiste numa PCR multiplex que contém o marcador TSPY (Simoni *et al.*, 2004), com o par de *primers* respectivos (Tabela 6).

A reacção decorreu com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 62°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

3.3.2.3 PCR DDX3Y

A mistura de reacção é apresentada na Tabela 7, de acordo com o par de *primers* respectivo (Tabela 6).

A reacção decorreu com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 34 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 7: Mistura de reacção para as reacções de PCR do gene *DDX3Y*.

Componentes	Mistura para 1 reacção
H ₂ O (B/Braun)	18,2 µl
<i>PCR Gold Buffer</i> (Applied Biosystems®)	2,5 µl
MgCl ₂ (Solution 1,75M Applied Biosystems®)	1 µl
<i>dNTP's</i> (2,5mM Mix)	0,5 µl
Mix de Primers (25µmol/ µl)	0,5 µl
Amplitaq Gold™ (Applied Biosystems®)	0,3 µl
DNA	2 µl

3.3.2.4 PCR HSFY

A mistura de reacção é apresentada na Tabela 8, de acordo com o par de *primers* respectivo (Tabela 6).

A reacção decorreu com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 8: Mistura de reacção para as reacções de PCR dos genes *HSFY*.

Componentes	Mistura para 1 reacção
H ₂ O (B/Braun)	19,5 µl
<i>PCR Gold Buffer</i> (Applied Biosystems®)	2,5 µl
MgCl ₂ (Solution 1,75M Applied Biosystems®)	1 µl
<i>dNTP's</i> (2,5mM Mix)	0,5 µl
Mix de Primers (60µmol/ µl)	0,2 µl
Amplitaq Gold™ (Applied Biosystems®)	0,3 µl
DNA	1 µl

4. Resultados

No presente estudo foram analisadas 83 amostras de sangue periférico de indivíduos que apresentavam alterações citogenéticas (Figuras 15-17), em alguns casos também confirmadas por FISH. Todos os indivíduos apresentavam uma linha celular com monossomia do cromossoma X ou anomalias estruturais no mesmo cromossoma (Tabela 9).

Tabela 9: Amostras de sangue periférico e respectivos cariótipos.

Número de casos	Cariótipo	
8	45,X	Figura 15
1	45,X/46,XX	
1	45,X[9];46,XX[20]	
2	45,X[4];46,XX[25]	
13	45,X[3]/46,XX[27]	
1	45,X[4];46,XX[29]	
1	45,X[7];46,XX[51]	
1	45,X[6]/46,XX[52]	
3	45,X[5]/46,XX[53]	
11	45,X[4]/46,XX[54]	
1	45,X[6]/46,XX[54]	Figura 16
19	45,X[3]/46,XX[55]	
1	45,X/47,XXX	
2	45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[27]	
1	45,X[3]/47,XXX[1]/46,XX[26]	
1	45,X[3]/47,XXX[3]/46,XX[52]	
1	45,X[2]/47,XXX[2]/46,XX[54]	
3	45,X[3]/47,XXX[1]/46,XX[54]	
2	45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[55]	
1	45,X[4]/47,XXX[2]/46,XX[71]	Figura 17
1	45,X,inv(21)(p12q22.1)[6]/47,XXX[1],inv(21)(p12q22.1)/46,XX[51],inv(21)(p12q22.1)	
1	45,X[13]/46,X,der(X)[6]	
1	46,X,inv(X)(p22.1q13)	
1	46,X,?dup(X)(q25q27)	
1	46,X,?dup(X)(q26)	
1	46,X,del(X)(p11.2)	
2	46,X,del(X)(q24)	
1	46,X,inv dup del (X) (qter --->q24 :: p22.1 --->qter)	
83		

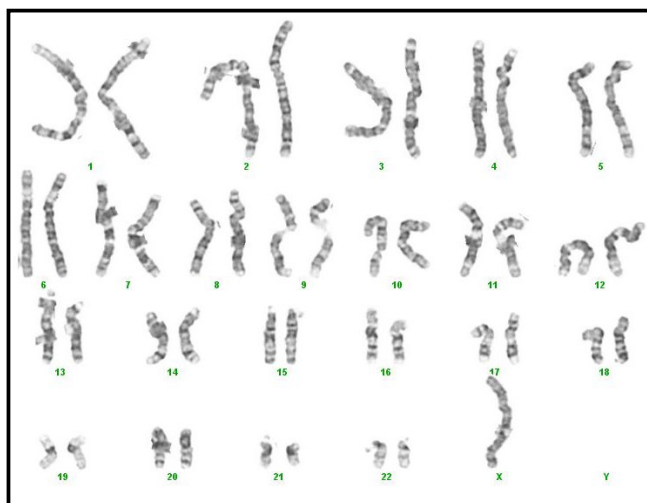


Figura 15: Cariótipo – 45,X.

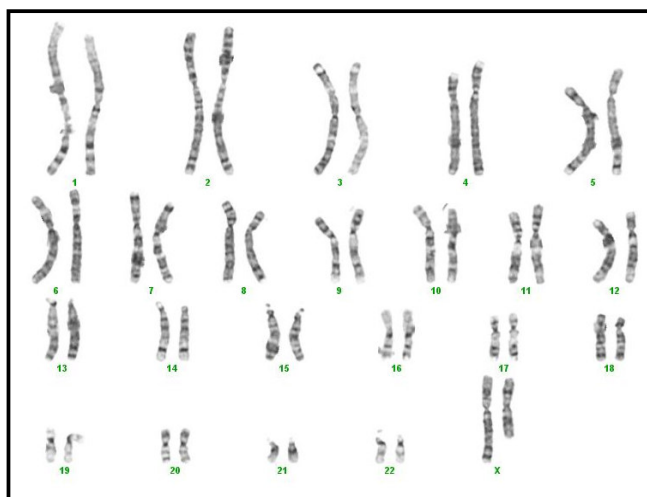


Figura 16: Cariótipo - 46,X,del(X)(q24).

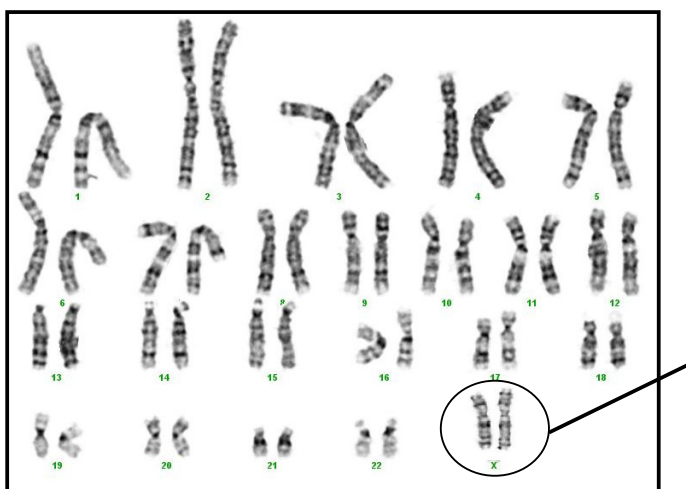


Figura 17: Cariótipo - 46,X,inv dup del (X) (qter--->q24 :: p22.1 ---->qter).

Neste estudo foram ainda analisadas 19 amostras de produtos de abortamento (Tabela 10) e 5 amostras de líquido amniótico (Tabela 11):

Tabela 10: Amostras de produtos de abortamento e respectivos cariótipos.

Número de casos	Cariótipo
17	45,X
1	45,X[12]/46,XX[5]
1	45,X[26]/46,X,del(Xq)[22]/46,XX[2]
19	

Tabela 11: Amostras de líquidos amnióticos e respectivos cariótipos.

Número de casos	Cariótipo
5	45,X
5	

4.1 Integridade do DNA

Após a extracção de DNA foi realizada uma reacção de PCR para o gene da amelogénina (*AMXY*) em todas as amostras tendo como objectivo verificar a integridade do DNA (Figura 18). Das 107 amostras analisadas (sangues – produtos de abortamento – líquidos), em 9 não ocorreu amplificação (Tabela 12). Estas amostras não foram incluídas na posterior pesquisa molecular das sequências do cromossoma Y.

Tabela 12: Resultados obtidos para o gene da *AMXY*.

Amostra Biológica	Número Total de casos	Falha de amplificação
Sangue Periférico	83	2
Produtos de Abortamento	19	4
Líquidos Amnióticos	5	3
	107	9
% falha de amplificação (9/107) = 8,4%		

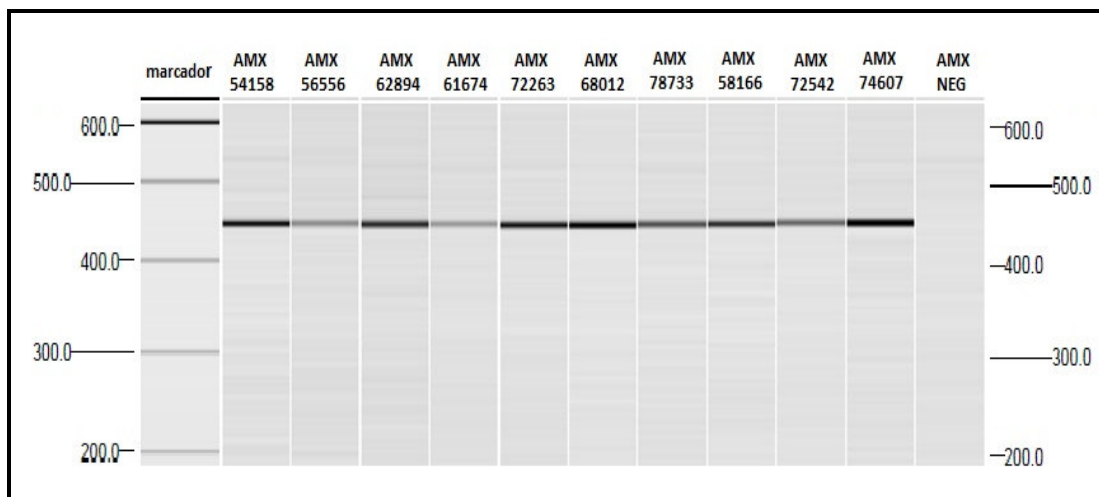


Figura 18: Electroforese capilar após PCR para o gene *AMXY*. O produto de PCR de 432pb corresponde ao cromossoma X. Linha 1: marcador; Linhas 2 a 11: amostras positivas; Linha 12: controle negativo de PCR.

4.2 Pesquisa das sequências do cromossoma Y

Nas 98 amostras em que ocorreu amplificação para o gene da *AMXY*, foram realizadas quatro reacções de PCR distintas para determinar a presença/ausência de quatro genes mapeados no cromossoma Y (*SRY*, *TSPY*, *DDX3Y* e *HSFY*).

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 13 a 16, e Figuras 19 a 21, respectivamente para os genes *SRY*, *TSPY*, *DDX3Y* e *HSFY*.

Tabela 13: Resultados obtidos para o gene *SRY*.

Amostra Biológica	Número de casos	PCR + para o gene <i>SRY</i>
Sangue Periférico	81	1
Produtos de Abortamento	15	2
Líquidos Amnióticos	2	0
	98	3
Resultado em % (3/98) = 3,06%		

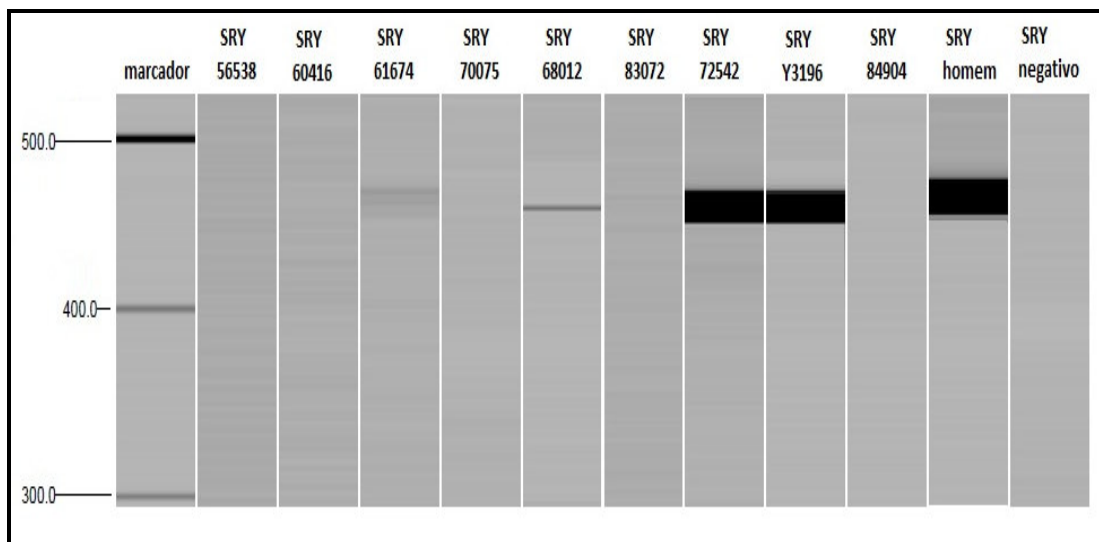


Figura 19: Electroforese capilar após PCR para o gene *SRY*. O produto de PCR tem um tamanho de 472pb. Linha 1: marcador; Linha 2, 3, 5, 7 e 10: amostras sem amplificação; Linha 4, 6 e 8: amostras com amplificação para o gene *SRY*; Linha 9: controle positivo – amostra já estudada e com amplificação para o gene *SRY*; Linha 11: controle positivo (homem); Linha 12: controle negativo de PCR. Todas as amostras aqui representadas correspondem a amostras de sangue periférico, excepto as linhas 6 e 8 que correspondem a produtos de abortamento.

Tabela 14: Resultados obtidos para o gene *TSPY*.

Amostra Biológica	Número de casos	PCR + para o gene <i>TSPY</i>
Sangue Periférico	81	0
Produtos de Abortamento	15	2
Líquidos Amnióticos	2	0
	98	2
Resultado em % (2/98) = 2,04%		



Figura 20: Electroforese capilar após PCR Multiplex para o gene *TSPY*. O produto de PCR para o *TSPY* tem um tamanho de 273pb. Linha 1: marcador; Linha 2 e 4: amostras com amplificação para o gene *TSPY*; Linha 3: amostra sem amplificação; Linha 5: controle positivo (homem); Linha 6: controle negativo de PCR. Todas as amostras aqui representadas correspondem a amostras de produtos de abortamento.

Tabela 15: Resultados obtidos para o gene *DDX3Y*.

Amostra Biológica	Número de casos	PCR + para o gene <i>DDX3Y</i>
Sangue Periférico	81	0
Produto de Abortamento	15	1
Líquidos Amnióticos	2	0
	98	1
Resultado em % (1/98) = 1,02%		

Tabela 16: Resultados obtidos para o gene *HSFY*.

Amostra Biológica	Número de casos	PCR + para o gene <i>HSFY</i>
Sangue Periférico	81	0
Produto de Abortamento	15	0
Líquidos Amnióticos	2	0
	98	0
Resultado em % (0/98) = 0%		

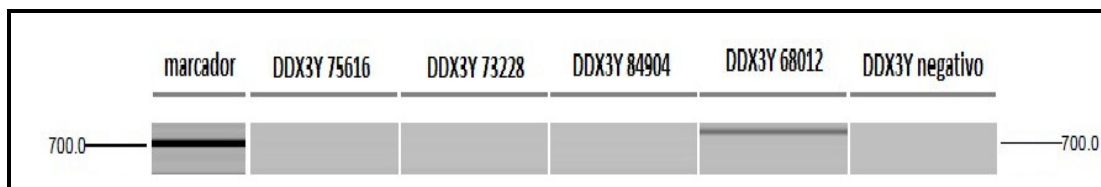


Figura 21: Electroforese capilar após PCR para o gene *DDX3Y*. O produto de PCR tem um tamanho de 688pb. Linha 1: marcador; Linha 2, 3 e 4: amostras sem amplificação para o gene *DDX3Y*; Linha 5: amostra com amplificação do gene *DDX3Y*; Linha 6: controle negativo de PCR. Todas as amostras aqui representadas correspondem a amostras de produtos de abortamento.

Em resumo, na Tabela 17 são indicados todos os resultados positivos obtidos, correspondentes a cada amostra.

Tabela 17: Resultados positivos nas diferentes amostras.

Número	Amostra	Resultado Citogenética	<i>SRY</i>	<i>TSPY</i>	<i>DDX3Y</i>	<i>HSFY</i>
61674	Sangue Periférico	45,X	+	-	-	-
68012	PA (tecido gonadal)	45,X	+	+	+	-
72542	PA	45,X	+	-	-	-
78733	PA	45,X	-	+	-	-

5. Discussão e Conclusão

A expressão fenotípica de uma paciente com Síndrome de Turner está efectivamente relacionada com o cariótipo e com a identificação do mosaicismo do cromossoma X. A Síndrome de Turner apresenta características clínicas muito variáveis, desde a baixa estatura que ocorre em 98% dos casos, pescoço alado, implantação baixa do cabelo, *cubitus valgus*, dificuldades motoras e cognitivas, malformações cardíacas, amenorreia primária e infertilidade (Scales *et al.*, 2010). Assim, pacientes com mosaicismo com a linha celular 46,XX ou duplicação do braço longo têm um fenótipo moderado, ao contrário, por exemplo, do atraso mental que é mais frequente em pacientes com pequenos cromossomas em anel e deleções de um dos cromossomas X (Wiktor *et al.*, 2005). Assim, e tendo em conta as alterações citogenéticas encontradas, é mais fácil entender a variabilidade fenotípica encontrada nas amostras seleccionadas para este trabalho, onde as principais indicações para o estudo foram a infertilidade, baixa estatura, amenorreia primária e má evolução pubertária. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre o número de dismorfias por doente e o respectivo cariótipo.

A maioria das pacientes com Síndrome de Turner apresentam “vestígios gonadais” resultantes da atresia acelerada dos folículos ovários e, como resultado, são inférteis. À maioria destas pacientes é recomendada a fertilização *in-vitro* com óvulos de dadores em que a taxa de gravidez por ciclo é aproximadamente de 40%, valor semelhante ao de outras populações de pacientes que se submetem aos mesmos tratamentos de fertilidade. Contudo, a taxa de abortamento entre estas pacientes é mais elevada (40%-50%) devido, essencialmente, à existência de útero hipoplásico e possivelmente à diminuição da receptividade do endométrio (Kavoussi *et al.*, 2006).

Citogeneticamente, a Síndrome de Turner é caracterizada por uma monossomia do cromossoma X (45,X) em 45% dos casos (Wolff *et al.*, 2010). Em cerca de 75% dos casos 45,X, o cromossoma X é de origem materna, pelo que o erro de segregação cromossómica ocorre durante a meiose masculina ou já após fertilização (Ferrão *et al.*, 2002).

Para além desta monossomia do cromossoma X é possível a presença de outras linhas celulares com dois ou mais cromossomas X (mosaico) ou cromossomas com anomalias estruturais do cromossoma X.

É de referir que, em 20%-25% dos pacientes 45,X não é possível detectar qualquer tipo de mosaicismo. Uma vez que mais de 99% das concepções 45,X resultam em abortamento espontâneo antes das 28 semanas de gestação, a razão para estes indivíduos terem escapado à elevada taxa de abortamento, pode ser a existência de mosaicismo embrionário, em que a linha celular 46,XX, está presente num órgão essencial para a sobrevivência intra-uterina, embora não seja expresso nos tecidos analisados (mosaicismo confinado à placenta) ou então por mosaicismo no embrião e uma subsequente perda da linha celular secundária devido à selecção *in-vivo* (Held *et al.*, 1992).

A detecção do mosaicismo é determinada principalmente por quatro factores: o tipo e número de tecidos analisados, o número de células estudadas, a sensibilidade das técnicas utilizadas no diagnóstico e a possibilidade de selecção em *in-vivo* ou *in-vitro* que pode resultar no desaparecimento de linhas celulares (Held *et al.*, 1992; de Oliveira *et al.*, 2009).

Considerando que a análise citogenética clássica possui baixa sensibilidade para a detecção de mosaicismos sub-representados, a pesquisa de sequências do cromossoma Y em indivíduos com Síndrome de Turner não deverá ser feita exclusivamente através da determinação do cariótipo, mas complementada com metodologias com elevada sensibilidade e especificidade, tais como o FISH e o PCR. Ambas as técnicas permitem a detecção de linhas celulares de baixa representação e possíveis alterações estruturais (Fernández *et al.*, 1996).

Os linfócitos do sangue periférico são geralmente o material escolhido para a análise citogenética das pacientes com suspeita da Síndrome de Turner, devido à facilidade de obtenção das amostras. No entanto, deve ser considerada a análise de outro tecido, nos casos em que não seja detectado qualquer mosaicismo no sangue periférico. A amostra do segundo tecido deverá ter origem embrionária diferente, por exemplo, mucosa oral (de Oliveira *et al.*, 2009).

Pacientes com presença do cromossoma Y ou cromossomas derivados do Y identificados por técnicas de citogenética convencional apresentam um risco aumentado (15-30%) de desenvolvimento de gonadoblastoma. Este facto faz com que a detecção de mosaicismos do cromossoma Y de baixo grau em pacientes com Síndrome de Turner assumam uma importância clínica crucial.

Sugere-se, assim, que a pesquisa de sequências específicas do cromossoma Y seja efectuada por rotina em indivíduos 45,X em que a análise citogenética não revele a

presença de mosaicismo, e ainda nas doentes com Síndrome de Turner em que seja identificado um cromossoma marcador ou que apresentem sinais de virilização (Ferrão *et al.*, 2002).

A gonadectomia profilática é o procedimento escolhido para eliminar a malignidade gonadal nas pacientes com Síndrome de Turner portadoras de sequências do cromossoma Y. Este procedimento “consensual” foi questionado, em 2000, por Gravholt e colaboradores devido ao risco mínimo de desenvolver gonadoblastoma encontrado nas suas pacientes. Estes autores analisaram 114 pacientes com Síndrome de Turner usando a técnica de PCR e detectaram sequências do cromossoma Y em 14 (12,2%) das pacientes estudadas. Destas, 10 submeteram-se a uma gonadectomia profilática e apenas numa paciente foi encontrada a neoplasia esperada (Gravholt *et al.*, 2000). Posteriormente, em 2004, Canto e colaboradores defenderam a realização da gonadectomia profilática nas pacientes Turner. Para tal realizaram um estudo onde analisaram 107 pacientes com Síndrome de Turner e detectaram sequências do cromossoma Y em 10 (9,3%). Seis destas pacientes (60%) foram submetidas a gonadectomia e o gonadoblastoma estava presente em duas (20%) pacientes (Canto *et al.*, 2004).

No âmbito do presente trabalho, usando a técnica de PCR, pesquisaram-se os seguintes *loci* específicos do cromossoma Y: o gene *SRY* (*sex determinig region on the Y chromosome*), o gene *TSPY* (*testis-specific protein, Y-encoded*), o gene *DDX3Y* (*DEAD/H box polypeptide, Y-chromosome*) e o gene *HSFY* (*heat shock transcription factor, Y chromosome*). A inclusão destes genes nesta pesquisa deveu-se, por um lado, à sua importância funcional e estrutural no cromossoma Y e, por outro, à possibilidade de caracterizar diferentes regiões do cromossoma Y. Assim sendo, detectou-se uma frequência de 4,08% (4/98) de amostras com material do cromossoma Y presente em linhas celulares minoritárias. Esta frequência enquadra-se nos resultados obtidos em vários estudos realizados ao longo do tempo sobre esta temática, onde são descritas frequências de material do cromossoma Y oculto variando entre 0% e 60% (Bianco *et al.*, 2009).

Em 1998, López e colaboradores estudaram 50 pacientes com Síndrome de Turner usando a técnica de PCR e observaram a presença de sequências específicas do cromossoma Y em 12% das pacientes 45,X. Esta percentagem aumentou para 24% quando foram incluídos os casos com mosaicismo (Lopez *et al.*, 1998). Em 2006, Bianco e colaboradores estudaram 20 pacientes com Síndrome de Turner usando a técnica de PCR

em amostras de diferentes tecidos e detectaram em 35% das pacientes 45,X a presença de sequências específicas do cromossoma Y em pelo menos um dos tecidos (Bianco *et al.*, 2006). Em 1995, Coto e colaboradores analisaram 18 pacientes com Síndrome de Turner usando a técnica de PCR e detectaram a sequência *SRY* em 20% das pacientes 45,X e numa paciente com cariótipo em mosaico 45,X/46,XX (Coto *et al.*, 1995). Em 1998, Quilter e colaboradores estudaram 50 pacientes com Síndrome de Turner usando a técnica de PCR que revelou em dois casos a presença de sequências do cromossoma Y (Quilter *et al.*, 1998). Num estudo posterior, que incluiu 52 amostras 45,X, foram encontrados 2 gonadoblastomas, e a presença de material do cromossoma Y foi confirmado por PCR em ambos os casos (Francisco *et al.*, 2003).

Em 2008, Bianco e colaboradores analisaram 5 pacientes com anomalias citogenéticas e detectaram a sequência *SRY* em 60% das amostras de sangue e 40% em amostras de cabelo e de mucosa oral (Bianco *et al.*, 2008).

Vários factores têm contribuído para as diferenças encontradas, tais como os critérios de selecção dos pacientes, o número de metafases analisadas no estudo citogenético, o tamanho da amostra, a metodologia utilizada e os marcadores escolhidos para o estudo das sequências no cromossoma Y.

Para este estudo, foram apenas seleccionadas amostras de pacientes com monossomia do cromossoma X ou cariótipos em mosaico, em que para além da linha celular 45,X, existem uma ou mais linhas celulares com os dois cromossomas sexuais normais ou com um estruturalmente anormal. Desta forma, excluíram-se alguns pacientes que apresentavam evidência citogenética da presença de material do cromossoma Y, factor que contribuiria para aumentar os valores percentuais obtidos.

Neste estudo, para além dos casos de sangue periférico foram também analisadas amostras de produtos de abortamento e de líquidos amnióticos em que, na maioria dos casos, o resultado citogenético era 45,X (22/24). Em 20% destas amostras (3/15) foram detectadas, pela técnica de PCR, sequências do cromossoma Y em linhas celulares minoritárias. De realçar os resultados positivos para os genes *SRY*, *TSPY* e *DDX3Y* num tecido gonadal. Nesta amostra não foi possível pesquisar a presença do gene *HSFY*, uma vez que a quantidade de DNA foi insuficiente. Possivelmente, esta amostra conteria todo o cromossoma Y.

Nos produtos de abortamento e nos líquidos amnióticos, após a extração de DNA e de forma a observar a sua integridade, foi observada uma elevada percentagem de falha de amplificação no gene *AMXY*, 29,2% (7/24), em comparação com as amostras obtidas a partir de sangue periférico, 2,40% (2/83). Este facto poderá ser explicado pela utilização de diferentes *kits* de extração de DNA nas diferentes amostras, uma vez que, posteriormente e em todas elas, foi utilizado o mesmo protocolo de PCR.

Analizados todos os resultados obtidos neste trabalho, pode concluir-se que os estudos moleculares contribuirão para confirmar a existência, ou não, de sequências do cromossoma Y em linhas celulares minoritárias, identificar com precisão os *loci* do cromossoma Y presentes e ausentes, permitindo estabelecer correlações com dismorfias características do Síndrome de Turner e esclarecer a formação de cromossomas Y estruturalmente anómalos, com identificação mais precisa dos pontos de quebra.

Este tipo de estudo constitui um método complementar de diagnóstico que contribui, indispensavelmente, para a confirmação do diagnóstico clínico, para a decisão de proceder, (ou não), a uma gonadectomia profiláctica e para o estabelecimento de uma melhor correlação genótipo/fenótipo.

6. Perspectivas futuras

Com o presente estudo foi possível aprofundar o conhecimento sobre algumas questões relativamente à temática Síndrome de Turner.

No entanto, seria interessante e importante, a continuação deste estudo de forma a complementá-lo. Assim, aqui ficam algumas sugestões de variáveis a explorar e que, com toda a certeza, ajudariam a completar a investigação neste tema.

- fazer nova análise citogenética aumentando o número de células analisadas em cada paciente;
- pesquisar a presença das mesmas sequências do cromossoma Y, nas mesmas pacientes, mas utilizando amostras de tecidos com diferente origem embrionária, por exemplo mucosa oral;
- utilizar técnicas mais sensíveis que o PCR, como por exemplo o PCR *nested*;
- verificar se alguma das pacientes da amostra deste estudo desenvolveu gonadoblastoma.

Continua sem resposta a questão relativa à frequência de material derivado do cromossoma Y em pacientes com Síndrome de Turner associada à probabilidade de ocorrência de gonadoblastoma nestas, encontrando-se esta temática longe de estar esgotada.

7. Bibliografia

Bianco, B, Lipay, M, Guedes, A, Oliveira, K and Verreschi, ITN. SRY Gene Increases the Risk of Developing Gonadoblastoma and/or Nontumoral Gonadal Lesions in Turner Syndrome. *International Journal of Gynecologic Pathology* 2009;28:197-202.

Bianco, B, Lipay, MV, Melaragno, MI, Guedes, AD and Verreschi, IT. Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19:1113-1117.

Bianco, B, Nunes Lipay, MV, Guedes, AD and Verreschi, IT. Clinical implications of the detection of Y-chromosome mosaicism in Turner's syndrome: report of 3 cases. *Fertil Steril* 2008;90:1197 e1117-1120.

Birkebaek, N, Crüger, D, Hansen, J, Nielsen, J and Bruun-Petersen, G. Fertility and pregnancy outcome in Danish women with Turner syndrome. *Clinical Genetics* 2002;61:35-39.

Canto, PF, Kofman, A, Jimenez, A, Soderlund, D, Barron, C, Reyes, E, Mendez, J and Zenteno, J. Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences. 2004;70-72.

Coto, E, Toral, JF, Menendez, MJ, Hernando, I, Plasencia, A, Benavides, A and Lopez-Larrea, C. PCR-based study of the presence of Y-chromosome sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1995;57:393-396.

de Oliveira, RM, Verreschi, IT, Lipay, MV, Eca, LP, Guedes, AD and Bianco, B. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J* 2009;127:373-378.

Deepak, M and Deepa, B. Y chromosome mosaicism and occurrence of gonadoblastoma in cases of Turner syndrome and amenorrhoea. *Reproductive biomedicine online* 2007;15:547-553.

Fernández, R, Méndez, J and Pásaro, E. Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. *Human Genetics* 1996;98:29-35.

- Ferrão, L, Lopes, ML, Limbert, C, Marques, B, Boieiro, F, Silva, M, Marques, R, Lavinha, J, Mota, A and Gonçalves, J. Screening for Y chromosome sequences in patients with Turner Syndrome. *Acta Médica Portuguesa* 2002;15:89-100.
- Ford, CE, Jones, KW, Polani, PE, De Almeida, JC and Briggs, JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959;1:711-713.
- Francisco, AL-N, Soto, M, Sanchez, MA, Fernandez, E and Lanes, R. Molecular analysis in Turner syndrome. *J Pediatr* 2003;142:336-340.
- Garagorri, J. Síndrome de Turner: 9o Curso de Formación de Postgrado, Zaragoza, 2003 (2004) J & C Ediciones Médicas.
- Gravholt, C, Fedder, J, Naeraa, RW and Muller, J. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. 2000.
- Held, KR, Kerber, S, Kaminsky, E, Singh, S, Goetz, P, Seemanova, E and Goedde, HW. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* 1992;88:288-294.
- Kavoussi, SK, Christman, GM and Smith, YR. Healthcare for adolescents with Turner syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2006;19:257-265.
- Li, Y, Tabatabai, ZL, Lee, TL, Hatakeyama, S, Ohyama, C, Chan, WY, Looijenga, LH and Lau, YF. The Y-encoded TSPY protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* 2007;38:1470-1481.
- Lopez, M, Canto, P, Aguinaga, M, Torres, L, Cervantes, A, Alfaro, G, Mendez, JP and Kofman-Alfaro, S. Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1998;76:120-124.
- Mann, K, Donaghue, C, Fox, SP, Docherty, Z and Ogilvie, CM. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur J Hum Genet* 2004;12:907-915.
- Murthy, SK and Demetrick, DJ. New approaches to fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 2006;319:237-259.
- Otero, JMG. Morgagni, Ullrich, and Turner: The Discovery of Gonadal Dysgenesis. *The Endocrinologist* 1995;5:327-328.

Pardue, ML and Gall, JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;64:600-604.

Patsalis, PC, Sismani, C, Hadjimarcou, MI, Kitsiou-Tzeli, S, Tzezou, A, Hadjiathanasiou, CG, Velissariou, V, Lymberatou, E, Moschonas, NK and Skordis, N. Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clin Genet* 1998;53:249-257.

Patsalis, PC, Skordis, N, Sismani, C, Kousoulidou, L, Koumbaris, G, Eftychi, C, Stavrides, G, Ioulianos, A, Kitsiou-Tzeli, S, Galla-Voumvouraki, A, Kosmaidou, Z, Hadjiathanasiou, CG and McElreavey, K. Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. *Am J Med Genet A* 2005;135:145-149.

Pergament, E, Chen, PX, Thangavelu, M and Fiddler, M. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2000;20:215-220.

Quilter, CR, Taylor, K, Conway, GS, Nathwani, N and Delhanty, JD. Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome. *Ann Hum Genet* 1998;62:99-106.

Quintana-Murci, L, Krausz, C and McElreavey, K. The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Sci Int* 2001;118:169-181.

Rauschendorf, MA, Zimmer, J, Hanstein, R, Dickemann, C and Vogt, PH. Complex transcriptional control of the AZFa gene DDX3Y in human testis. *Int J Androl* 2010;

Regateiro, FJ. *Manual de Genética Médica* (2003) 1ª ed.

Saiki, RK, Scharf, S, Faloona, F, Mullis, KB, Horn, GT, Erlich, HA and Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.

Sato, Y, Yoshida, K, Shinka, T, Nozawa, S, Nakahori, Y and Iwamoto, T. Altered expression pattern of heat shock transcription factor, Y chromosome (HSFY) may be related to altered differentiation of spermatogenic cells in testes with deteriorated spermatogenesis. *Fertil Steril* 2006;86:612-618.

- Scales, R and Weber, C. Turner syndrome: do not miss this diagnosis. *J Pediatr Nurs* 2010;25:66-68.
- Schmidt, W, Jenderny, J, Hecher, K, Hackeloer, BJ, Kerber, S, Kochhan, L and Held, KR. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod* 2000;6:855-860.
- Shaffer, LG and Bejjani, BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 2004;10:221-226.
- Shinka, T, Sato, Y, Chen, G, Naroda, T, Kinoshita, K, Unemi, Y, Tsuji, K, Toida, K, Iwamoto, T and Nakahori, Y. Molecular characterization of heat shock-like factor encoded on the human Y chromosome, and implications for male infertility. *Biol Reprod* 2004;71:297-306.
- Simoni, M, Bakker, E and Krausz, C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl* 2004;27:240-249.
- Skaletsky, H, Kuroda-Kawaguchi, T, Minx, PJ, Cordum, HS, Hillier, L, Brown, LG, Repping, S, Pyntikova, T, Ali, J, Bieri, T, Chinwalla, A, Delehaunty, A, Delehaunty, K, Du, H, Fewell, G, Fulton, L, Fulton, R, Graves, T, Hou, SF, Latrielle, P. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003;423:825-837.
- Su, M-T, Lee, Iw and Kuo, P-L. Presence of TSPY transcript and absence of transcripts of other Y chromosomal genes in a case of microscopic gonadoblastoma. *Gynecologic Oncology* 2006;103:357-360.
- Tarani, L, Lampariello, S, Raguso, G, Colloridi, F, Pucarelli, I, Pasquino, AM and Bruni, LA. Pregnancy in patients with Turner's syndrome: Six new cases and review of literature. *Gynecological Endocrinology* 1998;12:83-87.
- Thilaganathan, B, Sairam, S, Ballard, T, Peterson, C and Meredith, R. Effectiveness of prenatal chromosomal analysis using multicolor fluorescent in situ hybridisation. *BJOG* 2000;107:262-266.
- Verma, R and Babu, A. Human chromosomes: principles and techniques (1995) McGraw-Hill.

Verp, MS and Simpson, JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:191-218.

Wiktor, AE and Van Dyke, DL. Detection of low level sex chromosome mosaicism in Ullrich-Turner syndrome patients. *Am J Med Genet A* 2005;138A:259-261.

Wolff, DJ, Van Dyke, DL, Powell, CM and Committee, AWGotALQA. Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genetics in Medicine* 2010;12:52-55

Yoon, HR, Park, YS and Kim, YK. Rapid prenatal detection of down and edwards syndromes by fluorescent polymerase chain reaction with short tandem repeat markers. *Yonsei Med J* 2002;43:557-566.